G. ZARNEA

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

MINISTERUL ÎNVĂȚĂMÎNTULUI

Prof. dr. G. ZARNEA

MICROBIOLOGIE GENERALĂ

EDITURA DIDACTICĂ ȘI PEDAGOGICĂ — BUCUREȘTI, 1970

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Introducere şi istoric 11
Virusurile 23
1. Istoric 23
2. Definiţia şi caracterele generale ale virusurilor 24
3. Morfologia virusurilor 26
4. Organizarea particulei virale 27
5. Simetria virusurilor 31
a. Virusurile cu simetrie helicală 31
b. Virusurile cu simetrie icozaedrică 35
c. Virusurile complexe 43
6. Compoziţia chimică a virusurilor 46
7. Cultivarea virusurilor 48
8. Multiplicarea virusurilor 49
a. Biosinteza VMT 56
b. Replicarea ribovirusurilor animale 58
c. Replicarea virusurilor cu ADN 61
9. Relaţii între virusuri şi celula-gazdă parazitată 63
a. Caracterizarea complexelor virus-celulă 63
b. Virulenţa virusurilor 64
c. Patologia celulelor animale infectate de virus 64
10. Sistematica virusurilor 66
11. Relaţiile dintre virusuri şi organismul-gazdă 66
a. Infecţia virală aparentă 66
b. Infecţia virală inaparentă 70
c. Infecţia virală latentă 70
d. Tropismul virusurilor 71
12. Imunitatea în viroze 72
Interferonul 73
13. Virusurile oncogene 74
a. Oncogeneza datorită virusului poliomului (virus ADN) 79
b. Oncogeneza datorită virusului sarcomului Rous (virus ARN) . . . 81
14. Virusurile oncolitice 84
15. Natura virusurilor 84
16. Originea şi evoluţia filogenetică a virusurilor 86
Bacteriofagii 89
1. Anatomia şi structura moleculară a fagului 89
2. Infecţia celulei bacteriene. Replicarea fagului 94
3. Relaţii ecologice între fag şi bacteria sa gazdă 103
Lizogenia 104
Proprietăţile bacteriilor lizogene 106
4. Importanţa fenomenului de bacteriofagie. Aplicaţii practice 107
Organizarea celulară a microorganismelor 108
1. Caracterele generale ale celulelor procariote 108
2. Caracterele generale ale celulelor eucariote 110

Scanned with OKEN Scanner

Anatomia bacteriilor 113
1. Morfologie 113
2. Dimensiunile bacteriilor 117
3. Structura internă a celulei bacteriene 119
a. Peretele celular 120
b. Protoplaştii şi sferoplaştii 124
c. Membrana citoplasmatică 125
d. Mezozomii 126
e. Citoplasma 127
f. Materialul nuclear 129
g. Ribosomii 132
h. Cromatoforii 134
i. Sporul 135
j. Vacuolele 142
k. Incluziile 143
l. Capsula şi stratul mucos 145
m. Cilii sau flagelii 148
n. Pilii 155

Compoziţia chimică a bacteriilor 157
1. Apa 161
2. Acizii nucleici 161
3. Proteinele 162
3. Glucidele 162
5. Lipidele 163
6. Substanţele minerale 163
7. Pigmenţii bacterieni 164
8. Echipamentul enzimatic 165

Metabolismul bacterian 167
1. Metabolismul energetic la bacterii 172
2. Procesele de asimilare la bacterii 178
3. Principalele tipuri de nutriţie bacteriană 179
a. Bacteriile fotosintetizante (fototrofe) 180
b. Bacteriile chimiosintetizante (chimiotrofe) 185
4. Factorii de creştere 188
5. Metabolismul glucidic la microorganisme 189
6. Metabolismul lipidelor la bacterii 191
7. Metabolismul proteinelor la bacterii 192
a. Degradarea aminoacizilor de către bacterii 193
b. Biosinteza aminoacizilor 194
c. Biosinteza proteinelor 196
8. Luminescenţa bacteriană 196

Creşterea şi multiplicarea bacteriilor 198
1. Creşterea bacteriilor 198
2. Multiplicarea bacteriilor 200
3. Evoluţia unei culturi bacteriene 204
4. Culturile şi coloniile bacteriene 207

Influenţa factorilor fizici şi chimici din mediu asupra microorganismelor 212
1. Acţiunea factorilor fizici asupra microorganismelor 212
a. Temperatura de dezvoltare 212
b. Energia radiantă 220
c. Acţiunea lasserului asupra microorganismelor 225
d. Presiunea osmotică 226
e. Presiunea hidrostatică 328
f. Acţiunea ultrasunetelor 228

Scanned with OKEN Scanner

2. Acţiunea substanţelor chimice asupra microorganismelor 229
a. Substanţe antimicrobiene acţionînd prin modificări de permeabilitate . 231
b. Substanţe antimicrobiene acţionînd prin denaturarea proteinelor . . 234
c. Substanţe antimicrobiene acţionînd prin interferenţă cu grupările active ale proteinelor-enzime 236
d. Substanţe antimicrobiene active prin inhibiţie competitivă . . . 238
e. Substanţele chimioterapeutice antimicrobiene 240

Apariţia şi evoluţia bacteriilor pe Pămînt 241
1. Apariţia bacteriilor pe Pămînt 241
2. Evoluţia la bacterii 245

Principii de sistematică bacteriană 250
1. Conceptul de specie bacteriană 252
2. Criteriile de clasificare a bacteriilor 253
3. Importanţa structurii genetice pentru taxonomia bacteriană 255
4. Norme generale de nomenclatură a bacteriilor 256

Rickettsiile 260

Micoplasmele 263

Formele „L“ 268

Actinomicetele 270

Ciuperci microscopice 278
1. Levurile 278
a. Morfologie şi structură internă 279
b. Compoziţia chimică 284
c. Metabolism 285
d. Reproducere 286
e. Taxonomie 290
f. Răspîndire în natură şi importanţă 291
2. Mucegaiurile 291
a. Organizare celulară 293
b. Structură internă 295
c. Metabolism 295
d. Dinamica procesului de creştere 296
e. Reproducere 297
f. Taxonomie 303
g. Răspîndire în natură şi importanţă 304

Noţiuni de genetică a microorganismelor 305
1. Rolul genetic al acizilor nucleici 308
2. Structura fizico-chimică a ADN 310
Diversitatea raportului cantitativ al buzelor nucleice în lumea vie . 313
3. Replicarea ADN 314
a. Mecanismul replicării ADN 317
b. Replicarea ADN monocatenar 318
4. Funcţiile materialului genetic 321
5. Organizarea materialului genetic bacterian 322
a. Cromozomul bacterian 322
b. Episomii şi plasmidele 325
Fagul temperat 327
Factorii colicinogeni 327
Factorul de rezistenţă infecţioasă la antibiotice — factorul „r“ . . 328
6. Replicarea materialului genetic şi reglarea sintezei ADN. Teoria repliconului . 330
7. Coordonarea replicării ADN cu diviziunea celulară şi segregarea materialului rezultat din replicare 333

8. Genele 334
9. Codul genetic 336
10. Biosinteza proteinelor 348
a. Transcrierea informației genetice 349
b. „Traducerea" informației genetice 352
11. Relații între structura genelor și structura proteinelor. Colinearitatea genei și a produsului său proteic 362
12. Organizarea activităților celulei bacteriene. Controlul și integrarea funcțiilor celulare 363
a. Inhibiția activității enzimelor (inhibiția prin produs final, retroinhibiția sau inhibiția prin *feedback*) 367
b. Inducția sintezei enzimelor 370
c. Represia sintezei enzimelor 372
13. Modelul general de reglare a sintezei proteinelor 374
14. Mecanismul de reglare a reacțiilor catabolice la bacterii. Reglarea inducției enzimatice 378
15. Mecanismele de reglare a reacțiilor anabolice la bacterii 380
16. Controlul coordonat al activităților celulare 382
17. Importanța reglării metabolice pentru biologia bacteriilor 384
18. Variabilitatea la microorganisme 386
a. Mutațiile 387
Rata de apariție și frecvența mutațiilor 390
Argumente pentru caracterul spontan al mutațiilor 390
Bazele moleculare ale mutagenezei 392
Exemple de mutații la bacterii 394
Cauzele mutației spontane 396
Acțiunea agenților mutageni 396
Semnificația biologică a variabilității microorganismelor 399
b. Mecanismele de transfer genetic la bacterii 399
Transformarea 400
Transducția 405
Conjugarea 408
Sexducția sau F-ducția (transferul mediat de factorul F) 418
Filogenia factorului de sex la bacterii 419
c. Recombinarea genetică 419
19. Localizarea genelor pe cromozom. Harta genetică 423
a. Harta genetică a fagilor 427
b. Hărțile genelor 429

Noțiuni de ecologie microbiană 432
1. Răspîndirea microorganismelor în natură 432
a. Microflora apelor 435
b. Microflora aerului 437
c. Microflora solului 438
2. Căile de răspîndire a microorganismelor în natură 438
3. Relații ecologice între microorganisme și alte organisme 440
a. Relații ecologice între microorganisme și macroorganisme 441
b. Relații ecologice între microorganisme 448

Noțiuni de microbiologie medicală și imunologie 457

I. *Caracterele generale ale microorganismelor patogene* 457
1. Patogenitatea 457
2. Virulența 458
a. Factorii care condiționează virulența 458
b. Exotoxinele bacteriene 460
c. Endotoxinele bacteriene 463
d. Alte tipuri de toxine bacteriene 464
3. Infecțiozitatea 467

II. *Modificările produse de agenții patogeni în organism* 468
1. Infecția și boala 468
2. Condițiile de apariție a bolilor infecțioase 469
3. Evoluția procesului infecțios 473
4. Infecția la nevertebrate și la vertebratele inferioare 475

Elemente de imunologie 476
1. Mecanismele de bază ale imunității 476
2. Factorii celulari ai imunității. Fagocitoza 477
a. Anatomia și fiziologia sistemului fagocitar 478
b. Inflamația. Evoluția reacțiilor inflamatorii 481
c. Modificări biochimice asociate cu procesul inflamator 489
d. Tipuri de interacțiune între fagocite și agenții patogeni 490
e. Importanța factorilor celulari în imunitate 491
3. Factorii umorali ai imunității. Anticorpii 492
a. Date generale asupra antigenelor 492
b. Date generale asupra anticorpilor 494
c. Reacția antigen-anticorp 495
d. Locul de formare a anticorpilor 499
e. Rolul limfocitului în imunitate 500
f. Ipoteze asupra modului de formare a anticorpilor 504
g. Rolul timusului în imunogeneză 510
h. Dinamica răspunsului imunitar 512
i. Bazele celulare ale memoriei imunologice 514
4. Tipurile de imunitate 515
a. Rezistența sau imunitatea naturală 515
b. Imunitatea dobîndită 519

Noțiuni de microbiologia insectelor 527
1. Microflora contaminantă a antropodelor 528
2. Microorganismele simbiotice ale artropodelor 529
3. Rolul microorganismelor nepatogene în viața artropodelor 531
4. Bolile produse insectelor de către microorganismele patogene 533
5. Artropodele ca vectori ai microorganismelor patogene 534
6. Bacteriile „insecticide" 538

Elemente de microbiologia solului 541
1. Micropopulația solului 541
2. Procese microbiene din sol implicate în circuitul azotului în natură 545
a. Fixarea biologică a azotului atmosferic 545
b. Fixarea simbiotică a azotului molecular 550
c. Amonificarea 558
d. Nitrificarea 560
e. Denitrificarea 562
3. Procese microbiene din sol implicate în circuitul carbonului în natură 563
a. Descompunerea celulozei de către microorganisme 563
b. Degradarea microbiană a hemicelulozelor 567
c. Degradarea biologică a ligninei 567
4. Interrelații între microorganisme și plantele superioare 568
a. Acțiunea rizosferei asupra microorganismelor din sol 569
b. Influența microorganismelor din rizosferă asupra plantelor 570
c. Micorizele 571
5. Rolul microorganismelor în formarea și evoluția humusului 573
6. Aplicații practice ale microbiologiei solului; microorganismele ca fertilizatori biologici („îngrășămintele" bacteriene) 577
7. Importanța microorganismelor din sol 577

Scanned with OKEN Scanner

8. Rolul microorganismelor în circulaţia materiei în natură 578
a. Circuitul azotului 580
b. Circuitul carbonului 581
c. Circuitul fosforului 584
d. Circuitul fierului 585
e. Circuitul sulfului 586

Elemente de microbiologie marină 589

1. Caracteristicile generale ale microflorei marine 590
2. Densitatea microflorei marine şi factorii care o influenţează 591
3. Importanţa activităţii microorganismelor din mări şi oceane 593
4. Rolul microorganismelor în formarea nămolurilor terapeutice 594

Elemente de geomicrobiologie 596

1. Precipitarea bacteriană a sărurilor de calciu în mări 598
2. Rolul bacteriilor în geneza depozitelor de minereu de fier 598
3. Originea bacteriană a depozitelor de sulf 599
4. Rolul bacteriilor în formarea zăcămintelor de salpetru 600
5. Rolul microorganismelor în dezagregarea rocilor şi coroziunea pietrei . . . 601
6. Microbiologia petrolului 602
a. Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de petrol . . . 602
b. Rolul microorganismelor în liberarea, migrarea şi acumularea petrolului . 604
c. Rolul microorganismelor în degradarea produselor petroliere . . . 605
d. Utilizarea bacteriilor în exploatările petroliere 606
7. Rolul microorganismelor în formarea turbei 606
8. Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de cărbuni 607

Noţiuni de microbiologie industrială 608

1. Fermentaţia alcoolică 611
a. Fabricarea alcoolului etilic din cartofi şi cereale 612
b. Utilizarea microorganismelor în vinificaţie 614
c. Utilizarea microorganismelor în industria berii 615
d. Utilizarea microorganismelor în industria panificaţiei 618
e. Prepararea glicerinei pe cale fermentativă 617
2. Alte fermentaţii utilizate în industrie 619
3. Fermentaţia acetică 620
4. Fermentaţia lactică 622
5. Fermentaţia butirică 623
6. Topitul biologic al plantelor textile 624
7. Producerea pe cale biologică a altor acizi organici 627
a. Producerea de acid propionic 627
b. Producerea de acid gluconic 628
c. Producerea de acid citric 628
d. Producerea de acid gallic 629
e. Producerea aminoacizilor prin procese de fermentaţie 630
8. Biosinteza microbiană a vitaminelor 630
9. Giberelinele 633
10. Antibioticele 634
a. Antibioticele semisintetice 638
b. Acţiunea antibioticelor asupra microorganismelor 638
c. Mecanismul de acţiune al substanţelor antibiotice 639
d. Rezistenţa la antibiotice 641
e. Utilizările antibioticelor 643
11. Utilizarea microorganismelor în sinteze chimice 644
12. Producerea de alcaloizi derivaţi ai acidului lisergic 647
13. Utilizarea preparatelor enzimatice microbiene în industrie 648
a. Preparatele enzimatice polizaharidolitice 649

Scanned with OKEN Scanner

b. Preparatele enzimatice proteolitice 650
c. Penicilinaza 651
d. Drojdia comprimată 651
14. Utilizarea microorganismelor ca sursă de produse alimentare 651
15. Bazele microbiologice ale conservării produselor alimentare 654

Procese de degradare microbiană în natură 658

1. Degradarea microbiană a materialelor de natură proteică 658
2. Alterarea microbiană a materiilor grase 660
3. Degradarea microbiană a bumbacului 660
4. Degradarea microbiană a cauciucului şi a maselor plastice 661
5. Termogeneza microbiană 662
6. Producerea microbiană a „biogazelor" 663
7. Coroziunea bacteriană a metalelor 664
8. Blocarea bacteriană a conductelor de apă 666
9. Alterarea microbiană a suprafeţelor de sticlă 666

Bibliografie 667

Scanned with OKEN Scanner

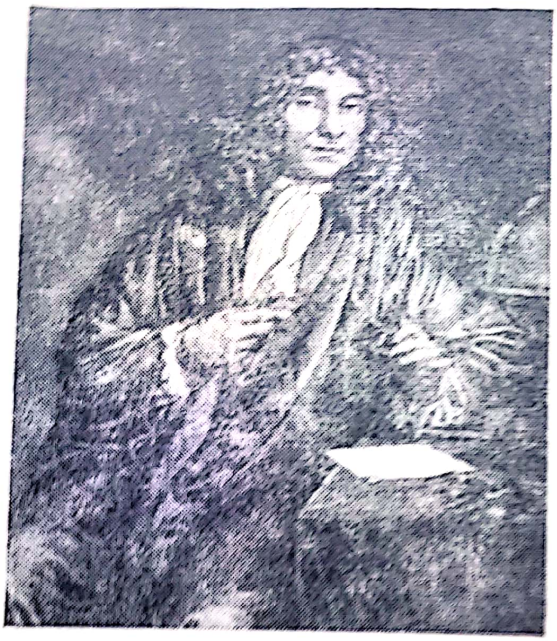
INTRODUCERE ŞI ISTORIC

Microorganismele alcătuiesc un grup vast şi eterogen de organisme diferite ca morfologie, activitate biologică şi poziţie sistematică, avînd drept caractere comune dimensiunile microscopice care le fac invizibile cu ochiul liber, organizarea lor în general unicelulară şi o structură internă relativ simplă. În acest grup sînt incluse bacteriile, ciupercile microscopice (mucegaiurile şi drojdiile), algele şi protozoarele. În mod obişnuit, la lumea microorganismelor considerată ca obiect de studiu, se ataşează şi un domeniu al naturii esenţial diferit, acela al virusurilor, care nu sînt de fapt organisme. Virusurile sînt entităţi corpusculare de dimensiuni infime şi, ca atare, invizibile la microscopul optic, alcătuite din componentele chimice esenţiale şi definitorii ale organismelor vii — proteinele şi acizii nucleici — dar lipsite de atributele structurale şi funcţionale ale organizării celulare, ceea ce le face inapte de a exista autonom şi de a se multiplica în afara unei celule vii, adică le obligă la un parazitism intracelular absolut.

Microorganismele reprezintă obiectul de studiu al *Microbiologiei*, ştiinţă cu un domeniu de cercetare foarte larg, din care s-au desprins cu timpul ramuri capabile de a se dezvolta ca ştiinţe independente, cum ar fi: *Bacteriologia, Imunologia, Virologia, Microbiologia solului, Microbiologia industrială* etc.

Microbiologia este o ştiinţă încă tînără, datorită faptului că punerea în evidenţă şi descrierea microorganismelor nu au fost posibile decît după construirea unui instrument optic care să le facă accesibile observaţiei — *microscopul*. Din cele mai vechi timpuri există însă descrieri ale bolilor astăzi cunoscute ca fiind provocate de microorganisme, boli care au suscitat întotdeauna un interes deosebit, datorită gravităţii lor şi mai ales modului în care se propagă, făcînd un mare număr de victime în comunităţile umane sau printre animale.

Ideea curentă în primele orînduiri sociale, că asemenea boli sînt manifestări ale mîniei divine şi, ca atare, se pot vindeca numai prin conjurarea acesteia cu ajutorul jertfelor şi rugăciunilor a fost treptat abandonată şi s-a trecut la încercări de explicare ştiinţifică, bazate pe observaţii şi interpretări realiste, desigur în limitele cunoştinţelor existente în epoca respectivă. Hipocrat (400 î.e.n.), întemeietorul medicinei, ia în considerare participarea a doi factori în geneza acestor boli: unul intrinsec, reprezentat de constituţia bolnavului, şi altul extrinsec, constînd dintr-o alterare de natură necunoscută a aerului, care devine prin el însuşi nociv. Această primă ipoteză asupra etiologiei bolilor infecţioase a persistat multă vreme sub forma *teoriei miasmelor* (de la gr. *miasma* — ema-



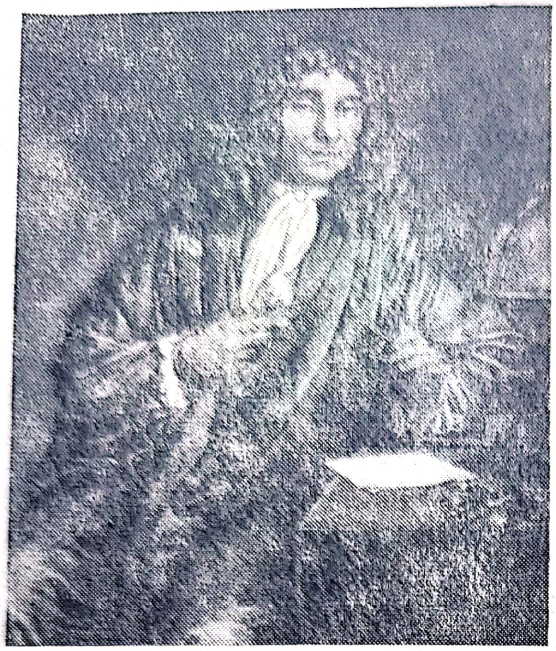
Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723)

nație putridă, murdărie). Într-o variantă mai concretă ea a fost formulată de Varon (100 i.e.n.), care considera că alterarea aerului (de aici și termenul *malaria* = aer rău) este determinată de animale foarte mici, invizibile, care pătrund în organism prin gură și prin nări.

Prima incercare de înlăturare a acestei concepții, devenită nesatisfăcătoare, se datorește lui Girolamo Fracastor (1488—1553), care a intuit foarte corect una dintre caracteristicile esențiale ale bolilor produse de microorganisme, și anume contagiozitatea lor. În lucrarea sa *De contagionibus et contagiosis morbis et eorum curatione* (1566), Fracastor arată că „infecția este aceeași pentru cel care a primit-o și pentru cel care a dat-o" și că ea este produsă de „particule mici și imperceptibile", „seminaria morbi", care trec de la un animal bolnav la altul sănătos. Fiind pur ipotetică, această concepție nu s-a putut însă impune, astfel că legătura între boală și un agent patogen microbian nu s-a mai făcut pînă în epoca pasteuriană, cînd a și fost dovedită experimental.

Este probabil că după încercările nereușite din secolul al XIII-lea ale lui Roger Bacon (1214—1294), primul microscop compus — care de altfel nici nu a fost folosit pentru studiul microorganismelor — a fost construit în jurul anului 1590 de frații Zaccharias și Hans Jansen din Middeburg, sub forma unui instrument lung de aproape 2 m. După anul 1610, Galileo Galilei construiește și el un instrument similar. Denumirea de „microscop" pare a fi fost creată de Demisciano, de la Academia dei Lincei (1614) sau de Johannes Faber von Bamberg, în timp ce Francis Bacon (1561—1626), în opera sa *Novum Organon* (1620), dădea noului dispozitiv denumirea de „perspicillum".

Descoperirea lumii microorganismelor se datorește observațiilor unui cercetător amator, Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723). Folosind ca „microscop" un sistem de lentile biconvexe de construcție proprie, cu o putere de mărire de 40—275 × și un sistem de iluminare probabil de tipul „cîmp întunecat", el observă și descrie spermatozoizi, armături bucale și ochi de insecte, solzi de pe aripile fluturilor și tot felul de microorganisme — protozoare, alge, levuri și bacterii — cărora le dă denumirea generică de „animalcula". Desenele și descrierea organismelor observate în diferite preparate microscopice de salivă, puroi și apă de canal sînt publicate în lucrarea sa *Arcana naturae ope microscopiorum detecta* (Tainele naturii descoperite cu ajutorul microscoapelor) din 1675. Cu toate că descoperirile lui Leeuwenhoek au stîrnit admirația și interesul oamenilor de știință, studiul microorganismelor a rămas



Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723)

naţie putridă, murdărie). Într-o variantă mai concretă ea a fost formulată de Varon (100 î.e.n.), care considera că alterarea aerului (de aici şi termenul *malaria* = aer rău) este determinată de animale foarte mici, invizibile, care pătrund în organism prin gură şi prin nări.

Prima încercare de înlăturare a acestei concepţii, devenită nesatisfăcătoare, se datoreşte lui Girolamo Fracastor (1488—1553), care a intuit foarte corect una dintre caracteristicile esenţiale ale bolilor produse de microorganisme, şi anume contagiozitatea lor. În lucrarea sa *De contagionibus et contagiosis morbis et eorum curatione* (1566), Fracastor arată că „infecţia este aceeaşi pentru cel care a primit-o şi pentru cel care a dat-o" şi că ea este produsă de „particule mici şi imperceptibile", „seminaria morbi", care trec de la un animal bolnav la altul sănătos. Fiind pur ipotetică, această concepţie nu s-a putut însă impune, astfel că legătura între boală şi un agent patogen microbian nu s-a mai făcut pînă în epoca pasteuriană, cînd a şi fost dovedită experimental.

Este probabil că după încercările nereuşite din secolul al XIII-lea ale lui Roger Bacon (1214—1294), primul microscop compus — care de altfel nici nu a fost folosit pentru studiul microorganismelor — a fost construit în jurul anului 1590 de fraţii Zaccharias şi Hans Jansen din Middeburg, sub forma unui instrument lung de aproape 2 m. După anul 1610, Galileo Galilei construieşte şi el un instrument similar. Denumirea de „microscop" pare a fi fost creată de Demisciano, de la Academia dei Lincei (1614) sau de Johannes Faber von Bamberg, în timp ce Francis Bacon (1561—1626), în opera sa *Novum Organon* (1620), dădea noului dispozitiv denumirea de „perspicillum".

Descoperirea lumii microorganismelor se datoreşte observaţiilor unui cercetător amator, Antonie van Leeuwenhoek (1632—1723). Folosind ca „microscop" un sistem de lentile biconvexe de construcţie proprie, cu o putere de mărire de 40—275 × şi un sistem de iluminare probabil de tipul „cîmp întunecat", el observă şi descrie spermatozoizi, armături bucale şi ochi de insecte, solzi de pe aripile fluturilor şi tot felul de microorganisme — protozoare, alge, levuri şi bacterii — cărora le dă denumirea generică de „animalcula". Desenele şi descrierea organismelor observate în diferite preparate microscopice de salivă, puroi şi apă de canal sînt publicate în lucrarea sa *Arcana naturae ope microscopiorum detecta* (Tainele naturii descoperite cu ajutorul microscoapelor) din 1675. Cu toate că descoperirile lui Leeuwenhoek au stîrnit admiraţia şi interesul oamenilor de ştiinţă, studiul microorganismelor a rămas

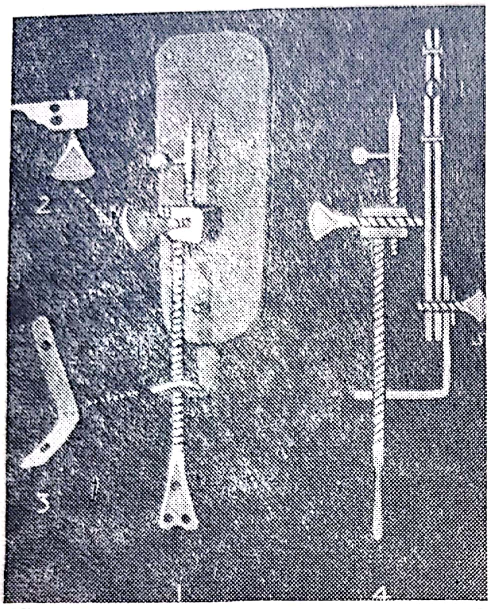


Fig. 1. Microscopul lui Leeuwenhoek: vedere posterioară (*1*) şi în secţiune diagramatică (*4*); *2* şi *3* — părţi componente. Preparatul este depus pe un şurub mobil şi examinat printr-o lentilă biconvexă (*l*) fixată între două plăci metalice (după Dobell).

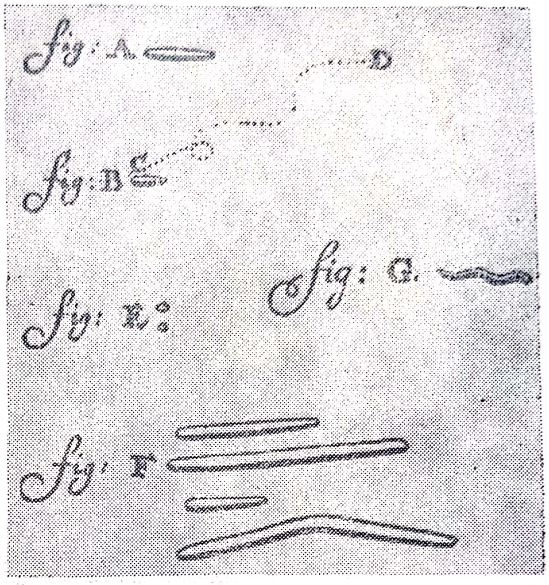


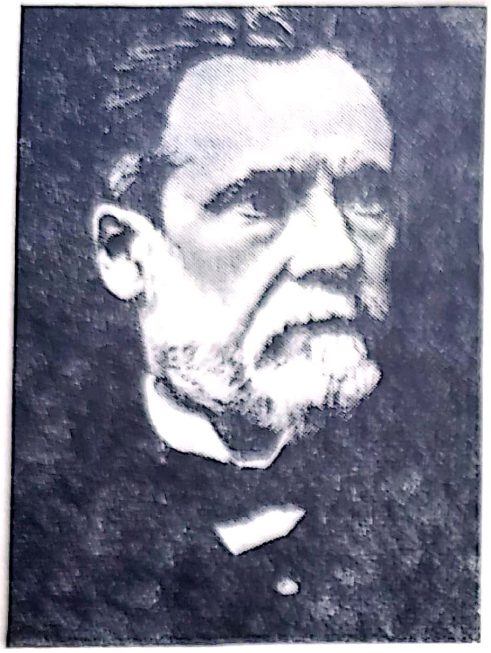
Fig. 2. Primele desene de bacterii (după Leeuwenhoek, 1683). Linia punctată dintre *B* şi *C* indică direcţia de deplasare a unei bacterii mobile.

în continuare empiric şi pur descriptiv, constituind doar o preocupare a unor amatori de curiozităţi ale naturii, prin a căror activitate se acumulează numai date disparate relativ la forma, structura, mărimea, abundenţa şi distribuţia în natură a acestor organisme.

În secolul al XVIII-lea, celebrul botanist Carl Linnaeus încercînd în opera sa *Systema naturae* (1735) o grupare sistematică a vieţuitoarelor cunoscute, reuneşte toate microorganismele într-un singur grup, numit semnificativ „Chaos". În 1775, M. M. Terehovski publică lucrarea *De chao infusorii Linnaei* în care, folosind pentru prima dată metode experimentale, demonstrează că fiinţele foarte mici observate în diferite infuzii bogate în substanţe organice cresc, se divid şi se mişcă datorită unor forţe interne proprii şi ajunge la concluzia că aceste organisme sînt adevărate animale în miniatură.

Primele lucrări de microbiologie experimentală sînt legate de problema generaţiei spontane şi se datoresc lui J. T. Needham (1713—1781) şi lui L. Spallanzani (1729—1799). Totuşi, microbiologia ia naştere ca ştiinţă abia prin lucrările marelui savant francez Louis Pasteur (1822—1895), care stabileşte principiile care stau şi astăzi la baza acestei ştiinţe şi face descoperiri de o importanţă teoretică şi practică fundamentală.

Domeniul microbiologiei a fost abordat incidental de Pasteur, ale cărui prime cercetări erau consacrate disimetriei moleculare a cristalelor de acid tartric.



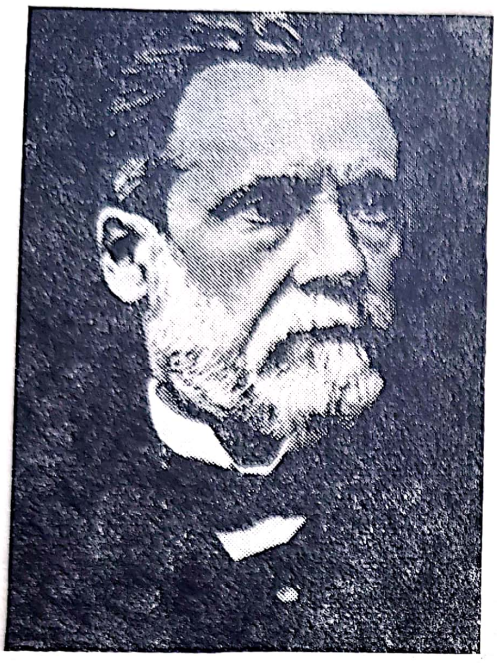
Louis Pasteur (1822—1895)

Pasteur stabilise că există un raport între morfologia cristalelor hemiedrice, caracterizate prin prezența unor fațete disimetrice, și capacitatea lor de a rota planul luminii polarizate. El a observat însă că dacă în amestecul racemic [1], inactiv din punct de vedere optic, se dezvoltă un mucegai *(Penicillium glaucum)*, soluția redevine optic activă, deviind însă de astă dată spre stînga planul luminii polarizate. Mucegaiul consumă, prin urmare, izomerul dextrogir, lăsînd intact pe cel levogir, care astfel poate fi izolat în stare pură. În afară de faptul că această descoperire furniza un procedeu simplu de separare a izomerilor optici, ea a mai demonstrat și intervenția unei caracteristici fizice, ca disimetria moleculară, în fenomenele chimice ale vieții dar, mai ales, a atras atenția lui Pasteur asupra unui fenomen spre care se va îndrepta în continuare curiozitatea lui de cercetător: microorganismele produc transformări ale substanțelor organice printr-o activitate fiziologică selectivă, foarte specifică.

Următoarea problemă abordată de Pasteur a fost natura biologică a fermentațiilor, în acea vreme încă subiect de controversă științifică. Concepțiile lui Cagnard-Latour (1836) și Schwann și Kutzing (1837), care arătaseră că „globulele" din mustul de strugure și din soluțiile zaharate sînt organisme vii (levuri), nu izbutiseră să se impună din cauza criticilor lui Berzelius, Liebig și Wöhler, care considerau fermentațiile drept fenomene pur chimice. Cercetările lui Pasteur asupra fermentațiilor normale și deviate ale vinului și berii l-au condus la următoarele concluzii fundamentale: *1)* fermentațiile sînt procese biologice determinate de acțiunea unor microorganisme anaerobe (capabile să se dezvolte în lipsa oxigenului din aerul atmosferic), deci „fermentația este viața fără aer"; *2)* fiecare tip de fermentație este produs de un anumit microorganism, care este specific în sensul că determină o anumită transformare a mediului pe care crește; *3)* dezvoltarea unui microorganism străin în mediul unde acționează un microorganism cu acțiune fermentativă specifică deviază cursul normal al fermentației în dauna calității (prin apariția de compuși noi, nedoriți) și a randamentului ei în produs util, determinînd o așa-numită „boală" a fermentației; *4)* microorganismele străine „contaminante" provin din aer, de pe vasele sau din ingredientele folosite în producție, putînd fi distruse prin încălzire.

Înainte de perioada pasteuriană, ideea participării microorganismelor la determinarea unor boli era respinsă ca nefiind probată pe cale experimentală. Vir-

[1] Amestec în proporții echimoleculare de cristale dextro- și levogire de tartrat.



Louis Pasteur (1822—1895)

Pasteur stabilise că există un raport între morfologia cristalelor hemiedrice, caracterizate prin prezenţa unor faţete disimetrice, şi capacitatea lor de a rota planul luminii polarizate. El a observat însă că dacă în amestecul racemic [1], inactiv din punct de vedere optic, se dezvoltă un mucegai *(Penicillium glaucum)*, soluţia redevine optic activă, deviind însă de astă dată spre stînga planul luminii polarizate. Mucegaiul consumă, prin urmare, izomerul dextrogir, lăsînd intact pe cel levogir, care astfel poate fi izolat în stare pură. În afară de faptul că această descoperire furniza un procedeu simplu de separare a izomerilor optici, ea a mai demonstrat şi intervenţia unei caracteristici fizice, ca disimetria moleculară, în fenomenele chimice ale vieţii dar, mai ales, a atras atenţia lui Pasteur asupra unui fenomen spre care se va îndrepta în continuare curiozitatea lui de cercetător: microorganismele produc transformări ale substanţelor organice printr-o activitate fiziologică selectivă, foarte specifică.

Următoarea problemă abordată de Pasteur a fost natura biologică a fermentaţiilor, în acea vreme încă subiect de controversă ştiinţifică. Concepţiile lui Cagnard-Latour (1836) şi Schwann şi Kutzing (1837), care arătaseră că „globulele" din mustul de strugure şi din soluţiile zaharate sînt organisme vii (levuri), nu izbutiseră să se impună din cauza criticilor lui Berzelius, Liebig şi Wöhler, care considerau fermentaţiile drept fenomene pur chimice. Cercetările lui Pasteur asupra fermentaţiilor normale şi deviate ale vinului şi berii l-au condus la următoarele concluzii fundamentale: *1)* fermentaţiile sînt procese biologice determinate de acţiunea unor microorganisme anaerobe (capabile să se dezvolte în lipsa oxigenului din aerul atmosferic), deci „fermentaţia este viaţa fără aer"; *2)* fiecare tip de fermentaţie este produs de un anumit microorganism, care este specific în sensul că determină o anumită transformare a mediului pe care creşte; *3)* dezvoltarea unui microorganism străin în mediul unde acţionează un microorganism cu acţiune fermentativă specifică deviază cursul normal al fermentaţiei în dauna calităţii (prin apariţia de compuşi noi, nedoriţi) şi a randamentului ei în produs util, determinînd o aşa-numită „boală" a fermentaţiei; *4)* microorganismele străine „contaminante" provin din aer, de pe vasele sau din ingredientele folosite în producţie, putînd fi distruse prin încălzire.

Înainte de perioada pasteuriană, ideea participării microorganismelor la determinarea unor boli era respinsă ca nefiind probată pe cale experimentală. Vir-

[1] Amestec în proporţii echimoleculare de cristale dextro- şi levogire de tartrat.

chow considera bolile ca rezultatul unor activităţi celulare anormale, iar Claude Bernard atribuia rolul de factori patogeni unor fermenţi eliberaţi chiar în organism sub acţiunea unei catalize misterioase. Pasteur extinde noţiunea de specificitate din domeniul fermentaţiilor în acela al patologiei omului şi animalelor, în sensul că orice boală infecţioasă este rezultatul activităţii vitale a unui anumit microorganism specific, care se dezvoltă ca parazit în organismul animal respectiv. Curînd după aceea, C. J. Davaine demonstrează cel dintîi rolul patogen al unei bacterii prin descoperirea bacilului cărbunelui care provoacă boala numită cărbune sau dalac.

Cercetările ulterioare ale lui Pasteur au avut ca rezultat punerea în lumină a principiului vaccinării şi stabilirea bazelor ştiinţifice ale preparării vaccinurilor, contribuind în acelaşi timp la descoperirea fenomenului de imunitate. Primul vaccin folosit în practică a fost cel antivariolic, preparat de medicul englez Edward Jenner (1749—1823). În 1796 acesta confirma — prin eficacitatea inocularii pe cale cutanată la om a unui preparat de „pulpă vaccinală" — observaţia sa, iniţial întîmplătoare, că în urma contactului accidental al tegumentului mîinilor cu pustulele de pe ugerul vacilor bolnave de vaccină se produce o infecţie uşoară, în urma căreia organismul uman capătă o rezistenţă solidă faţă de îmbolnăvirea de variolă, boală foarte gravă şi deseori mortală a omului. Cu toate implicaţiile practice excepţionale ale acestei descoperiri, ea a rămas fără ecou din punct de vedere ştiinţific, fenomenul pe care-l punea în evidenţă, rămas neexplicat, fiind considerat ca particular. Studiind boala denumită holera găinilor, Pasteur observă că agentul ei patogen îşi pierde complet, prin învechirea culturii, capacitatea sa specifică de a produce această boală, adică devine avirulent. Inoculată la păsări sănătoase, cultura avirulentă le conferă însă rezistenţa faţă de holeră, în sensul că ele nu se mai îmbolnăvesc nici dacă sînt infectate cu o cultură proaspătă, virulentă; păsările „vaccinate" au devenit „imune" (sînt apărate) în urma contactului lor prealabil cu agentul patogen specific lipsit de virulenţă Prin această descoperire, Pasteur pune bazele ştiinţifice ale vaccinării care au permis extinderea ei ca procedeu de prevenire a infecţiilor. Pe acelaşi principiu — a cărui descoperire i-a sugerat şi ideea foarte fecundă a variabilităţii microorganismelor sub acţiunea unor condiţii de mediu defavorabile — Pasteur a mai preparat şi utilizat cu succes vaccinul anticărbunos (1881), apoi vaccinul antirabic (1885), fapt deosebit de important din punct de vedere practic în ceea ce priveşte acesta din urmă, deoarece virusul care produce turbarea, boală pînă atunci ineluctabil mortală, nu putuse fi pus în evidenţă de Pasteur din cauza insuficienţei mijloacelor tehnice din acea vreme.

Tot Pasteur a fost acela care a rezolvat în mod decisiv problema generaţiei spontane. Teoria generaţiei spontane, conform căreia din materie lipsită de viaţă pot lua naştere plante şi animale, a părut în antichitate, aşa cum reiese din scrierile lui Aristotel şi Pliniu cel Bătrîn. Ea a continuat să fie admisă pînă la sfîrşitul Renaşterii, cînd a fost parţial abandonată. Totuşi, chiar mai tîrziu, în secolul al XVIII-lea, în timp ce studiul plantelor şi al animalelor aducea dovezi fără echivoc împotriva ei, primele cercetări efectuate pe microorganisme îi ofereau, dimpotrivă, argumente favorabile.

Ignorarea, pe atunci, a unor principii esenţiale, care mai tîrziu au stat la baza microbiologiei experimentale, în special în ceea ce priveşte sterilizarea (distrugerea germenilor preexistenţi de pe materialele de lucru şi din mediile de cultură), şi asepsia (împiedicarea contaminării cu germeni dinafară în timpul lucrului), au făcut posibilă concluzia falsă că microorganismele pot lua naştere prin organizarea spontană a substanţelor organice din produsele supuse fermentaţiei sau putrefacţiei. Folosind baloane speciale — baloane cu „gît de lebădă" — Pasteur demonstrează că un mediu de cultură sterilizat, în speţă bulionul de carne, poate rămîne steril timp indefinit, dacă se evită contaminarea lui cu germeni din aer. Într-adevăr, dacă prin înclinarea unui asemenea balon, mediul „spală" porţiunile incurbate ale gîtului rămas descoperit, porţiuni în care s-au sedimentat bacterii din aer, bulionul se infectează ca şi atunci cînd în mediul dintr-un balon obişnuit, cu gîtul drept, se introduce dopul de fulmicoton cu care fusese astupată gura balonului şi care a reţinut bacteriile din aer. Faptul că în baloanele cu mediu steril închise ermetic nu apar niciodată microorganisme, în timp ce acelaşi mediu se infectează dacă este lăsat în contact cu aerul, dovedeşte că microorganismele nu iau naştere spontan din materia organică inanimată, ci numai se înmulţesc în ea, pornind de la organisme similare provenite din mediul înconjurător.

Pentru denumirea organismelor microscopice Pasteur a adoptat termenul de „microb", creat de Sédillot, termen de altfel incorect, deoarece sensul său este „viaţă scurtă" şi nu „dimensiuni mici". Această denumire s-a păstrat însă, astfel că noua ştiinţă, avînd ca obiect studiul microbilor, a rămas cu numele de Microbiologie. Ea s-a dezvoltat, începînd chiar din timpul vieţii lui Pasteur, într-un ritm foarte rapid, graţie descoperirilor, perfecţionărilor tehnice şi perspectivelor teoretice.

Robert Koch (1843—1916) aduce în dezvoltarea microbiologiei ca ştiinţă contribuţii de ordin tehnic şi teoretic la fel de valoroase. El este acela care a introdus în tehnica microbiologică utilizarea mediilor de cultură solidificate (cu gelatină, pe atunci) pe care creşterea microorganismelor se face sub formă de colonii izolate, dacă suspensia folosită pentru însămînţare este suficient de diluată. Cum o colonie microbiană reprezintă de obicei descendenţa unei singure celule parentale, însămînţarea ei ulterioară într-un mediu steril generează o cultură de celule din aceeaşi specie sau *tulpină*. Descoperirea acestei posibilităţi de a obţine culturi pure a constituit un progres care a stat la

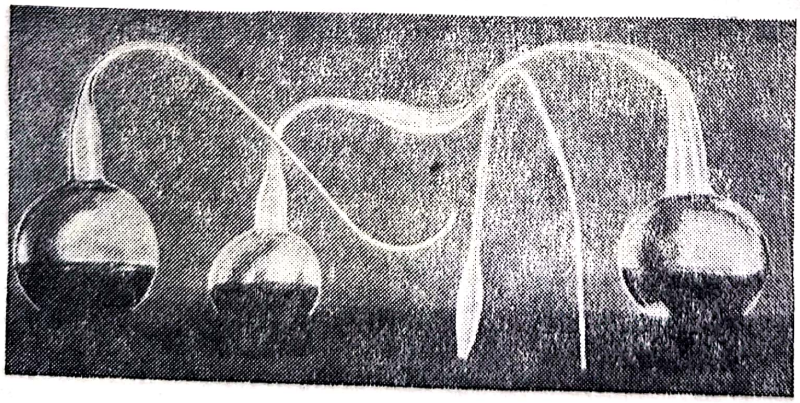
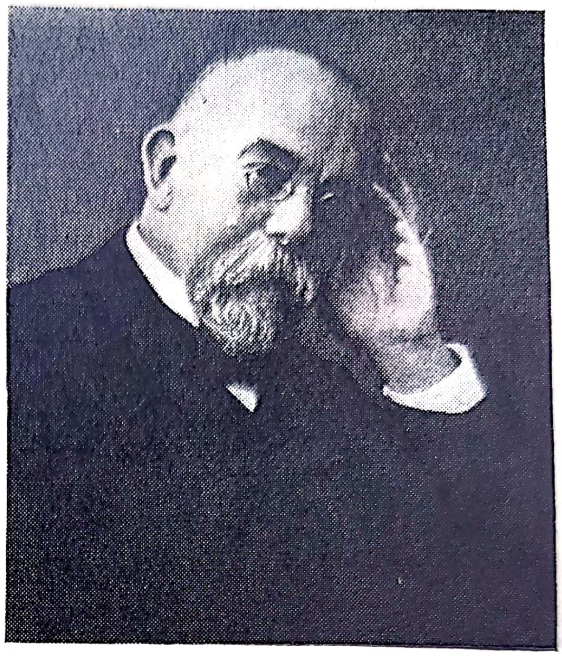


Fig. 3. Flacoane cu „gît de lebădă" folosite de Pasteur în experienţele sale asupra generaţiei spontane.

baza microbiologiei moderne, deoarece a oferit un mijloc simplu şi sigur de izolare a bacteriilor, în vederea studierii particularităţilor lor de specie şi a biologiei lor, a identificării şi a încadrării lor sistematice. Tot în laboratorul lui Koch au fost transpuse în practica microbiologică tehnicile de coloraţie cu coloranţi de anilină folosite în histologie, ceea ce a uşurat şi a îmbogăţit cu noi mijloace studiul microscopic al morfologiei bacteriene. Pe lîngă faptul că a descoperit mai multe specii de bacterii patogene, între care bacilul tuberculozei (*Mycobacterium tuberculosis* sau „bacilul lui Koch") şi vibrionul holerei, Koch a stabilit, în urma cercetărilor sale experimentale pe animale, criteriile indispensabile pentru ca un microb izolat dintr-un organism afectat de o anumită boală să poată fi considerat în mod justificat ca agentul cauzal al bolii respective. Aceste criterii, cunoscute sub denumirea de *postulatele lui Koch*, care reprezintă o dezvoltare şi transpunere în termeni concreţi a noţiunii pasteuriene de specificitate a activităţii patogene microbiene, sînt următoarele: *1)* microorganismul incriminat să poată fi întotdeauna pus în evidenţă în leziunile care i se atribuie; *2)* să poată fi obţinut în culturi pure pe medii artificiale; *3)* cultura lui pură inoculată la un animal receptiv să producă leziuni specifice, din care agentul patogen să poată fi reizolat. Rămas valabil pînă astăzi, în spiritul, dacă nu totdeauna în litera sa, postulatul lui Koch a reprezentat şi reprezintă încă un principiu eficace de lucru, a cărui respectare previne interpretările eronate în materie de diagnostic bacteriologic sau de identificare a unor noi agenţi patogeni infecţioşi.



Robert Koch (1843—1910)

Ilia Ilici Metchnikoff (1845—1916), biolog rus, lucrînd la Institutul Pasteur, a început prin a studia digestia intracelulară la echinoderme. Urmărind soarta unor particule de carmin adăugate în mediul unde erau întreţinute aceste animale, el observă că anumite celule din cavitatea lor generală sînt capabile să capteze şi să înglobeze granulele fine de carmin, ca şi alte particule cu care vin în contact. Pornind de la această observaţie, Metchnikoff emite ipoteza că celulele cu funcţie asemănătoare — denumite de al fagocite, adică celule care „mănîncă" — ar putea exista şi în organismul altor animale, cărora le-ar determina rezistenţa faţă de infecţie prin încorporarea şi digestia intracelulară a microorganismelor patogene pătrunse în mediul intern. Ulterior (1884), studiind infecţia crustaceului *Daphnia magna* cu ciuperca *Monospora bicuspidata*, numită azi, în onoarea sa, *Metschnikowia*, el

Ilia Ilici Metchnikoff
(1845—1916)

observă că sporii aciculari ai levurii pătrund o dată cu hrana în tubul digestiv al dafniei de unde, străbătînd peretele acestuia, trec în cavitatea generală a animalului, unde sînt atacaţi de celule mobile care se deplasează prin mişcări amoeboide, numite de el amoebocite. În cazul cînd infecţia este moderată, ameobocitele înglobează şi digeră toţi sporii ciupercii şi astfel crustaceul supravieţuieşte. Cînd însă infecţia este masivă, sporii rămaşi nefagocitaţi germinează şi dau naştere formei vegetative a ciupercii care, prin multiplicarea ei, invadează tot organismul dafniei, determinîndu-i moartea. Metchnikoff extinde rezultatele acestor observaţii la animalele superioare şi la om, demonstrînd prezenţa şi importanţa celulelor cu proprietăţi fagocitare, în reacţiile de apărare ale organismului faţă de bacteriile patogene, punînd astfel bazele unei ştiinţe noi — *imunologia*.

Buchner (1897) confirmă rezultatele cercetărilor lui Pasteur asupra fermentaţiilor şi le completează cu date noi. El demonstrează că şi extractul acelular obţinut din celulele drojdiei de bere, după dezintegrarea lor prin sfărîmare în mojar cu nisip, poate produce fermentaţia zahărului la alcool şi CO_2, datorită sistemului enzimatic complex pe care-l conţine — zimaza — care este activ şi după izolarea lui din celulele vii. Ulterior, în 1905, Harden şi Young arată că, în afară de enzimele termolabile cu molecule mari, extractul de drojdie de bere conţine şi un factor termostabil cu moleculă mică, absolut esenţial pentru funcţionarea sistemului enzimatic descris de Buchner. Acest factor este cozimaza, care, după cum s-a demonstrat foarte curînd după aceea, este implicată şi în metabolismul ţesuturilor animale. Studiul cozimazei levurilor a permis elucidarea mecanismului oxidării biologice şi a demonstrat că unul şi acelaşi factor este necesar ca un component esenţial al proceselor metabolice fundamentale la microorganisme şi în ţesuturile animale, ceea ce a constituit una dintre primele demonstraţii ale similitudinii proceselor metabolice de bază la organismele din întreaga natură vie. În acelaşi timp, aceste cercetări au deschis larg perspectiva excepţional de importantă a utilizării microorganismelor ca model experimental în diferite ramuri ale ştiinţelor biologice.

Paul Ehrlich (1854—1915), care a consacrat o bună parte din cercetările sale studiului reacţiilor imunologice ale organismului, este şi creatorul teoriei moderne a dezinfecţiei şi chimioterapiei selective. Bazat pe concepţia că trebuie să existe anumite substanţe cu activitate selectivă asupra paraziţilor, netoxice sau cu toxicitate slabă pentru celulele organismului-gazdă, el sintetizează primele substanţe chimice active în terapia bolilor produse de spirochete şi protozoare. Lucrările sale în acest domeniu au deschis calea spre era substan-

ţelor chimioterapice, care începe o dată cu realizarea sintezei sulfamidelor de către Domagk (1935) şi Tréfouël.

S. Winogradski (1856—1953), întemeietorul microbiologiei solului, lucrînd la Institutul Pasteur din Paris, a descris procesul de asimilare la organismele chimiosintetizante şi fenomenul de fixare a azotului atmosferic de către microorganisme. În acelaşi timp, el a elaborat metodele speciale pentru cercetarea activităţii microorganismelor din sol.

D. I. Ivanovski (1864—1920), după o serie de cercetări relativ la rolul microorganismelor din sol şi la interrelaţiile dintre aceste microorganisme şi plantele superioare, demonstrează că boala numită mozaicul tutunului este produsă de un agent patogen, invizibil la microscop, care traversează filtrele bacteriologice şi care poate fi transmis de la o plantă bolnavă la una sănătoasă prin intermediul filtratului acelular al trituratului de frunze cu leziuni.

M. W. Beijerinck (1851—1935) este primul cercetător care intuieşte natura deosebită a agentului patogen descoperit de Ivanovski — şi cunoscut azi ca fiind virusul mozaicului tutunului — şi îl consideră un „contagium vivum fluidum", un agent contagios viu dar necorpuscular. Considerat astăzi ca întemeietorul virologiei, el a adus de asemenea contribuţii foarte importante la cunoaşterea biologiei microorganismelor fixatoare de azot.

Descoperirea bacteriofagului — virus care parazitează bacteriile — făcută independent de Twort (1915) şi D'Hérelle (1917), a furnizat biologiei nu numai cunoaşterea unei entităţi noi, implicată în procesele ecologice şi evolutive din lumea microorganismelor, ci şi un model experimental preţios, reprezentat de sistemul fag-bacterie, care a contribuit într-o măsură nebănuită la restructurarea unor concepţii de bază în biologie.

Alexander Fleming (1881—1955) deschide prin lucrările lui era antibioticelor, de o importanţă excepţională în medicină şi biologie. În 1929 el observă că unele culturi ale mucegaiului *Penicillium* elaborează o substanţă cu proprietăţi antimicrobiene specifice — penicilina. Acest prim antibiotic cunoscut a fost mai tîrziu purificat de Florey şi Chain (1940), care au oferit astfel terapeuticii antiinfecţioase un produs cristalizat, stabil, atoxic pentru om şi animal, activ şi *in vivo* asupra unor anumite specii de microorganisme. În 1939, R. Dubos elaborează o tehnică generală care permite cercetarea sistematică a capacităţii de producere a antibioticelor la microorganismele saprofite, iar în 1944 S. A. Waksman descoperă *streptomicina*, antibiotic elaborat de unele specii de actinomicete, şi deschide prin cercetările sale calea pentru obţinerea din natură a numeroase antibiotice noi.

CONTRIBUŢIA CERCETĂTORILOR ROMÂNI LA DEZVOLTAREA ŞTIINŢELOR MICROBIOLOGICE

Victor Babeş (1854—1926), fondatorul microbiologiei româneşti, a depus o prodigioasă activitate de cercetător, profesor şi organizator.

V. Babeş a studiat numeroase boli ale omului, printre care lepra, tuberculoza, holera, febra tifoidă şi mai ales turbarea. El a descoperit în sistemul nervos al

Victor Babeş (1850—1926)

animalelor moarte de turbare, *corpusculii Babeş-Negri*, datorită cărora se poate stabili retrospectiv diagnosticul acestei infecţii. În colaborare cu Cornil, el este autorul primului tratat de bacteriologie din lume, apărut în 1885, *Bacteriile şi rolul lor în etiologia, anatomia şi histologia patologică a bolilor infecţioase*. În tehnica bacteriologică, Babeş a introdus procedeul de colorare vitală, care permite cercetarea structurii celulare bacteriene nealterate de artefacte. V. Babeş a studiat, de asemenea, asociaţiile microbiene, fiind primul cercetător care — după Pasteur — şi-a dat seama de importanţa pentru terapeutică a antagonismului microbian şi a substanţelor antibiotice. El a observat că dacă două specii de microorganisme se înmulţesc în acelaşi mediu de cultură, dezvoltarea unei dintre ele poate să ducă la excluderea totală a celeilalte şi a emis ipoteza folosirii eventuale în practică a acestui fenomen. V. Babeş a urmărit consecvent aplicarea rezultatelor cercetărilor sale, subliniind — în conferinţe şi articole — cauzele adînci, economice şi sociale ale unor boli care făceau ravagii în populaţia ţării, ca tuberculoza, sifilisul, pelagra etc.

Ioan Cantacuzino (1863—1934), creatorul Institutului de microbiologie care îi poartă numele şi al şcolii contemporane de microbiologie din ţara noastră, a fost elevul lui A. O. Kovalevski şi al lui Metchnikoff. Din bogata sa contribuţie ştiinţifică originală, printre cele mai importante lucrări sînt cele referitoare la aparatele şi funcţiile fagocitare în regnul animal (1896) şi la problema imunităţii la nevertebrate (1923). În aceste lucrări, el dă o interpretare fiziologică modernă fenomenelor de apărare a organismului faţă de agenţii patogeni. Cantacuzino a studiat de asemenea diferite boli ca holera, febra tifoidă, scarlatina, tuberculoza etc., creînd şi organizînd condiţiile producţiei de seruri şi vaccinuri în ţara noastră, ceea ce a contribuit la combaterea multor boli infecţioase grave. Savant progresist, înarmat cu o concepţie materialistă, el a promovat ideile înaintate din biologie şi prin conferinţe de popularizare la întrunirile din cluburile muncitoreşti socialiste (1894).

Perioada contemporană din istoria microbiologiei este caracterizată în primul rînd prin faptul că microorganismele au devenit un material de cercetare experimentală sau de studiu teoretic pentru specialiştii din domenii foarte diferite ale ştiinţei, ca medici, biologi, biochimişti şi chimişti, geneticieni, fizicieni şi chiar biostatisticieni şi matematicieni. Rezultatele astfel obţinute depăşesc cu mult, prin importanţa lor, limitele microbiologiei, determinînd, pe lîngă o adevărată revoluţie în unele dintre sectoarele de cercetare ale acestei ştiinţe, şi acumularea unor achiziţii de importanţă excepţională în biochimie (studiul me-

tabolismelor, sinteza proteinelor şi a enzimelor etc.), în genetică (descifrarea codului genetic, punerea în evidenţă a controlului genetic al diferitelor activităţi celulare, elucidarea mecanismelor de mutageneză etc.), în biologie (probleme legate de originea vieţii, diferenţierea celulară, evoluţie, variaţie şi ereditate etc.); în medicină (stabilirea cauzelor unor boli infecţioase, combaterea lor biologică sau chimioterapică, geneza cancerului etc.), în industrie (elaborarea unor procedee de biosinteză a vitaminelor, hormonilor, acizilor organici etc.) etc.

Ion Cantacuzino (1863—1934)

În această perioadă s-au ilustrat o serie de cercetători, cum au fost îndeosebi C. Levaditi (1874—1953), cu lucrări în domeniul virologiei, imunologiei şi chimioterapiei, C. Ionescu-Mihăieşti (1883—1962), cu cercetări relativ la fiziologia şi imunochimia bacilului tuberculos, la poliomielită, holeră, antrax etc. şi D. Combiescu (1887—1961), cu studii în domeniul imunologiei, rickettsiozelor, leptospirozelor, epidemiologiei etc.

*
* *

Rezultatele cercetărilor în domeniul microbiologiei, care s-au multiplicat necontenit pornind de la jaloanele puse în epoca pasteuriană, au dus la acumularea unui extrem de bogat material faptic şi la cristalizarea unor concepţii noi care au generat dezvoltarea unor ştiinţe microbiologice independente.

Între acestea, *Microbiologia generală* reprezintă o ştiinţă biologică fundamentală, care studiază particularităţile generale ale microorganismelor, anatomia, fiziologia, biologia şi sistematica lor, răspîndirea în natură şi relaţiile lor ecologice cu mediul extern animat (alte microorganisme, plantele, animalele şi omul) sau neanimat, originea şi evoluţia lor, fenomenele de ereditate şi variabilitate microbiană. Ca ştiinţă de sinteză, microbiologia generală se bazează şi pe datele ştiinţelor microbiologice aplicative şi ca atare ea reprezintă o răscruce indispensabilă în care se întîlnesc toate drumurile divergente ale ştiinţelor microbiologice aplicative, pentru a aduce şi a lua probleme noi de rezolvat, concepţii generale şi metode noi de investigaţie. Cadrul larg al microbiologiei moderne, contribuţia sa imensă la dezvoltarea multor ramuri ale biologiei şi implicaţiile ei largi teoretice şi practice în evoluţia altor ştiinţe determinate de posibilitatea utilizării microorganismelor ca model experimental fac ca o cunoaştere largă a principiilor fundamentale ale microbiologiei generale să fie de o necesitate absolută pentru orice biolog modern — indiferent de domeniul său de specialitate — ca şi pentru biochimist şi biofizician, genetician, medic, agronom, cercetător în industria fermentativă etc.

Scanned with OKEN Scanner

După poziţia sistematică a microorganismelor studiate, s-au diferenţiat cinci ramuri principale ale microbiologiei, care studiază cu precădere un anumit grup de microorganisme, şi anume: *virologia*, avînd ca obiect studiul virusurilor, ştiinţă separată complet în ultimii ani de microbiologie datorită faptului că aceste entităţi infecţioase nu mai sînt considerate ca microorganisme; *bacteriologia*, care studiază bacteriile; *micologia*, consacrată studiului ciupercilor microscopice; *algologia* — studiul algelor şi *protozoologia* — studiul protozoarelor [1].

Corespunzător unor anumite sectoare de probleme, la origine de interes mai mult practic, dar evoluînd ulterior şi în sensul dobîndirii unor perspective teoretice — uneori foarte largi — au apărut de asemenea cu timpul şi ştiinţe microbiologice aplicative, între care: 1) *microbiologia medicală umană şi veterinară;* 2) *patologia plantelor* (fitopatologie); 3) *imunologia;* 4) *microbiologia solului;* 5) *microbiologia industrială;* 6) *microbiologia marină;* 7) *microbiologia insectelor* etc.

Cadrul acestor discipline, principiile care stau la baza lor, ca şi principalele lor realizări vor fi expuse în capitolele corespunzătoare din partea a doua a lucrării de faţă.

Ţinînd seama de tot ceea ce s-a dovedit valabil în realizările microbiologiei clasice, care au asigurat fundamentarea ştiinţei complexe care este microbiologia actuală, în expunerea noţiunilor generale ale acestei ştiinţe ne vom strădui în cele ce urmează să nu omitem nimic nici din achiziţiile ei esenţiale datorate cercetării contemporane.

---

[1] Ţinînd seamă de caracterul didactic al acestei lucrări, algele şi protozoarele — care, conform planului actual de învăţămînt, sînt studiate în cadrul altor discipline — nu vor fi incluse în capitolele următoare.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSURILE

1. ISTORIC

Primele cunoştinţe referitoare la virusuri sînt de dată recentă (sfîrşitul secolului al XIX-lea). În schimb, bolile virale, datorită manifestărilor lor evidente şi uneori foarte grave, au fost cunoscute din cele mai vechi timpuri. Încă din anii 2500 î.e.n. în China existau descrieri ale variolei umane, care se refereau deopotrivă la simptomatologia şi la caracterul transmisibil al acestei boli, iar Aristotel (384—322 î.e.n.) afirma că rabia (turbarea) este transmisă prin muşcătura de cîine.

Denumirea de *virus* derivă, după Seiffert, de la cuvîntul grec *ios*, folosit iniţial pentru a desemna generic substanţele otrăvitoare produse de organisme vii, aşa cum este veninul de şarpe (de aici latinescul *virus*=venin), şi apoi, prin extinderea sensului, pentru orice substanţă sau agent care poate produce o boală. În observaţiile sale asupra turbării, Cornelius Aulus Celsus (50 î.e.n.) afirma că rabia este produsă de un „*virus*", atribuind bineînţeles acestui termen cu totul altă semnificaţie decît cea actuală.

Pasteur dovedeşte (1881—1885) infecţiozitatea sistemului nervos central al animalelor bolnave de rabie, prepară şi utilizează cu succes cel dintîi vaccin antirabic şi presupune că această boală se datoreşte unui microb foarte mic, invizibil cu mijloacele optice uzuale, şi care nu poate fi izolat prin metode obişnuite. În 1892, D. I. Ivanovski demonstrează că boala numită mozaicul tutunului este datorată unui agent infecţios invizibil la microscop şi care străbate filtrele bacteriene. Boala poate fi transmisă în serie de la o plantă la alta prin filtratele de lichid acelular extras din frunzele bolnave, ceea ce arată că în planta bolnavă are loc o multiplicare a agentului patogen. Caracterul cu totul particular al noului agent patogen, deosebirile dintre el şi microbi sînt sesizate de Beijerinck, care poate fi considerat pe drept cuvînt ca întemeietorul virologiei. Pentru a marca această natură diferită, el consideră virusul un *contagium vivum fluidum*, adică un agent transmisibil (contagios) viu, dar necorpuscular. În ultimele decenii marile descoperiri în domeniul tehnicii (microscopia electronică, ultracentrifugarea etc.) au permis izolarea, purificarea şi studiul complex al virusurilor, ca şi al particularităţilor reacţiilor dintre virusuri şi organismele gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

2. DEFINIŢIA ŞI CARACTERELE GENERALE ALE VIRUSURILOR

Virusurile reprezintă o categorie specifică de agenţi infecţioşi, structural şi fiziologic diferiţi de oricare dintre microorganismele cunoscute, ca şi de organitele celulare cu care s-ar putea asemăna prin dimensiunile lor infime. Ele sînt entităţi infecţioase — în general submicroscopice — avînd în structura lor un singur tip de acid nucleic (ADN sau ARN), strict parazite intracelular şi potenţial patogene. Lipsite de echipament enzimatic, virusurile sînt metabolic inerte şi incapabile de creştere şi multiplicare prin diviziune. Ele nu se pot înmulţi decît în celulele vii pe care le parazitează şi al căror metabolism îl deviază în sensul sintezei de constituenţi virali.

Virusurile sînt cele mai mici structuri biologice care dispun de toată informaţia genetică necesară pentru propria lor reproducere. Ele pot exista în trei stări distincte: *1*) *virion*, *2*) *virus vegetativ*, *3*) *provirus*.

Virionul — virusul infecţios matur — este o entitate complexă şi organizată. Complexitatea este determinată de prezenţa în structura sa a cel puţin două componente: una genetică, reprezentată de un acid nucleic (ADN sau ARN, dar niciodată ambele), care poartă informaţia genetică necesară pentru multiplicare, şi alta negenetică — de natură proteică — absolut necesară pentru exprimarea naturii virale a sistemului. Caracterul organizat al entităţii virale ţine de faptul că relaţiile spaţiale dintre cele două tipuri de constituenţi sînt definite şi constante. Astfel alcătuite, particulele virale pot fi considerate ca echivalente unor „vehicule" care transmit un acid nucleic infecţios de la o celulă receptivă la alta, servind ca organite foarte specializate pentru introducerea unui material genetic nou în celula-gazdă.

Virusurile au două atribute în comun cu organismele: *caracterul organizat şi complex al structurii lor* şi *capacitatea de replicare* (de a face còpii exacte) a acestei arhitecturi structurale, conform informaţiei codificate în acidul lor nucleic. În acelaşi timp însă, ele se deosebesc de organisme printr-o serie de trăsături fundamentale, şi anume: *1*) virusurile au un singur tip de acid nucleic, spre deosebire de organismele celulare, chiar cele mai simple, cum sînt bacteriile, care le posedă totdeauna pe ambele (ADN şi ARN); *2*) spre deosebire de genomul complex al organismelor celulare, care determină şi reglează întreaga activitate metabolică a celulei, genomul viral conţine aproape exclusiv instrucţiuni pentru replicarea acidului nucleic al particulei virale şi pentru sinteza proteinelor sale, fiind lipsit de informaţia necesară pentru elaborarea enzimelor, atît a celor implicate în biosinteza materialului de construcţie al proteinelor şi acizilor nucleici (aminoacizi, nucleotide), cît şi a celor din sistemul Lippman (enzimele răspunzătoare pentru producerea de energie cu potenţial ridicat); *3*) datorită lipsei unui echipament enzimatic propriu, virionul este lipsit de metabolism şi incapabil să crească şi să se

TABELUL 1

CARACTERE DIFERENȚIALE ALE VIRUSURILOR ȘI ORGANISMELOR CELULARE

		VIRUSURI	BACTERII
Unitatea de structură și funcție		Virionul	Celula
Stări posibile de existență		— *Virion* — virus infecțios matur (particulă virală completă) — *Virus vegetativ* — virus în faza de multiplicare în celula gazdă. — *Provirus* — genom viral legat de cromozomul celulei gazdă.	— *Celulă bacteriană* (forma vegetativă) — *Spor bacterian* (facultativ)
Organizare simetrică la nivel molecular și tip de simetrie		constantă; simetrie helicală, cubică sau complexă	absentă
Compoziție chimică	Acizi nucleici	ADN sau ARN exclusiv în genomul viral	ADN (genomul bacterian) și ARN în citoplasmă ca ARN*m*, ARN*t* și ARN*r*.
	Proteine	Număr limitat (1—5) de tipuri diferite — cu așezare simetrică (capsida virală)	Număr mare de tipuri (cîteva mii); rol structural sau enzime.
	Glucide	Absente; rareori prezente la unele virusuri.	prezente constant
	Lipide	Absente; rareori prezente la unele virusuri.	prezente constant
	Echipament enzimatic	absent *	prezent constant; complex
Proprietăți biologice	Producere de energie cu potențial ridicat (ATP)	absentă	prezentă
	Sinteza independentă a constituenților celulari	absentă	prezentă
	Capacitatea de creștere și diviziune	absentă	prezentă
	Modul de reproducere	obligator în celula gazdă, pornind exclusiv de la genomul viral ca model	independentă, pornind de la ansamblul integrat al constituenților celulari
	Parazitism absolut	obligat	absent

* Excepțional prezența de enzime fără rol în metabolism, favorizînd pătrunderea sau liberarea virusului din celula gazdă.

dividă ca bacteriile; 4) reproducerea particulei virale se face pornind numai de la materialul ei genetic, în timp ce microorganismele se reproduc pornind de la ansamblul integrat al constituenţilor lor celulari; 5) pentru sinteza proteinelor virale, genomul viral foloseşte ARN_t, enzimele, ribozomii şi materialul de construcţie (aminoacizii) aparţinînd celulei-gazdă *(parazitism absolut)*, spre deosebire de bacteriile parazite intracelular, care folosesc pentru biosinteză proprii lor constituenţi celulari; 6) unităţile proteice care îmbracă genomul viral sînt organizate într-un sistem care prezintă o simetrie de tip helical, de tip cubic sau de tip combinat (helical+cubic), care nu există la microorganisme; 7) spre deosebire de microorganisme (de exemplu, bacterii), a căror unitate de structură şi funcţie este *celula*, virusurile sînt lipsite de organizare celulară. *Deci virusurile nu sînt microorganisme* (L w o f f) (tab. 1).

3. MORFOLOGIA VIRUSURILOR

Ca morfologie, virionii pot aparţine unuia din următoarele tipuri principale: *forma cilindrică* alungită sau de bastonaş (virusul mozaicului tutunului, virusurile insectelor), *forma sferică* sau sferoidală întîlnită la multe virusuri ani-

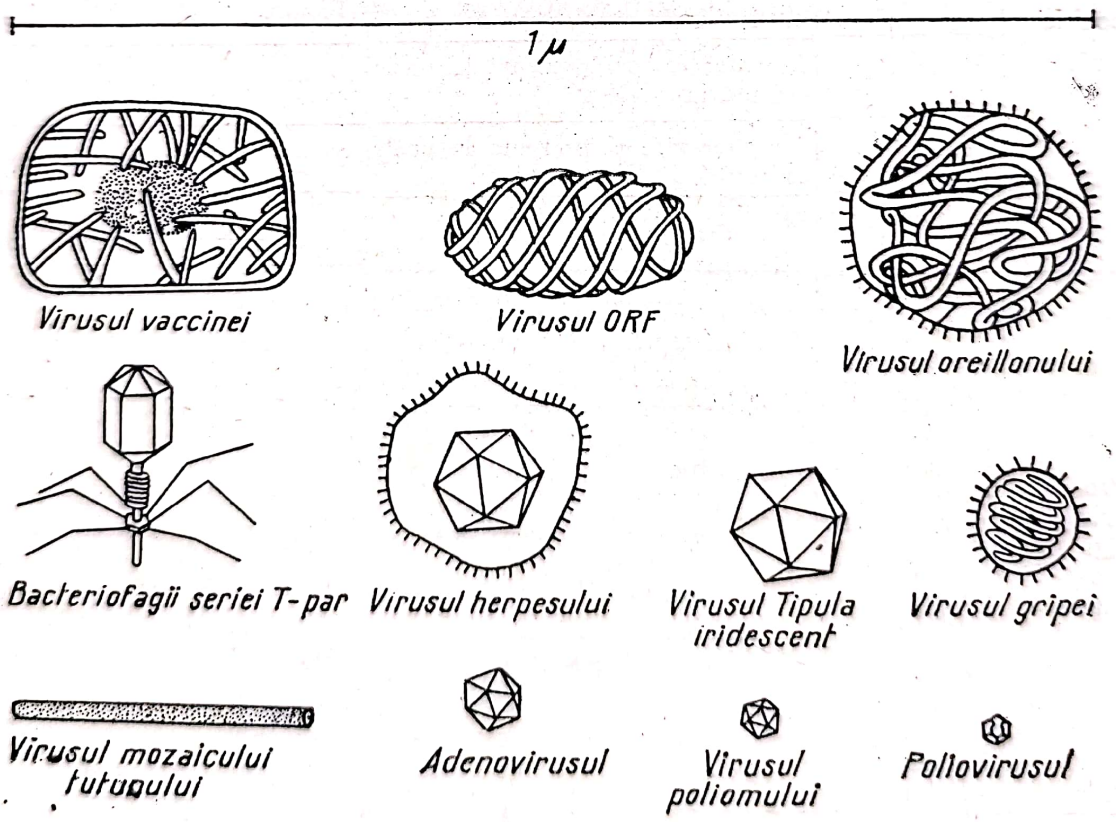


Fig. 4. Reprezentarea schematică şi dimensiunile relative ale principalelor virusuri (după Horne).

male (virusul gripal), *forma paralelipipedică* — asemănătoare unei cărămizi cu colţurile rotunjite — (virusurile din grupul variola — vaccina) sau *forma de mormoloc, spermatozoid* sau *cireaşă* cu coadă (majoritatea bacteriofagilor).

Dimensiunile virusurilor variază între 80 şi 100 Å ca limită inferioară şi 2 500 Å ca limită superioară (grupul variola-vaccina). Prin dimensiunile lor, virusurile ocupă o poziţie intermediară între moleculele organice mari şi rickettsii (bacterii parazite intracelular).

4. ORGANIZAREA PARTICULEI VIRALE

Aplicarea tehnicilor noi de biochimie şi biofizică la studiul caracteristicilor chimice şi de structură ale virusurilor a permis cunoaşterea constituenţilor structurali ai particulei virale, structura lor moleculară şi simetria lor.

În primul rînd, cu ajutorul tehnicilor de centrifugare analitică a fost posibilă obţinerea unor cantităţi mari de virus purificat. Difractograma în raze X a preparatelor foarte purificate de particule virale obţinute în formă cristalină şi paracristalină a pus în evidenţă o ordine internă strictă în alcătuirea virionului care prezintă tipuri (pattern) de simetrie de felul celor descrise la cristalele propriu-zise, ceea ce sugerează aranjarea simetrică a moleculelor care intră în construcţia structurilor externe virale.

În sfîrşit, microscopia electronică pe secţiuni ultrafine — efectuată cu ajutorul tehnicilor de umbrire şi dublă umbrire şi, mai ales, prin tehnica „colorării negative" (Brenner şi Horne, 1959) — a permis evidenţierea organizării structurale a virusurilor şi detectarea modului de aranjare a subunităţilor lor proteice de suprafaţă.

Constituenţii particulei virale. Greutatea moleculară foarte mare a preparatelor virale cristalizate a dus la ideea că virusurile mici sferice (virusul poliomielitei) şi cele cilindrice (VMT) — considerate iniţial ca fiind alcătuite dintr-o moleculă unică enormă — ar putea fi în realitate formate, după modelul macromoleculelor, dintr-o serie de subunităţi moleculare identice, aşezate în mod ordonat.

Bazele teoretice ale ipotezei relativ la realitatea acestui tip de construcţie au fost enunţate de Watson şi Crick (1956) care, analizînd mărimea şi structura genomului viral, au ajuns la concluzia că acesta este insuficient pentru a codifica sinteza unei molecule proteice enorme, ca şi pe aceea a unui număr mare de proteine diferite. Ca urmare, ei au presupus că învelişul proteic al virionului ar fi format din numeroase molecule proteice *identice*. Ca un corolar, Watson şi Crick consideră că acest tip de structură, în care construcţia învelişului viral este realizată prin utilizarea unui număr mare de proteine identice, impune cu necesitate o aranjare simetrică a subunităţilor identice, în aşa fel încît ele să aibă şi ambianţe chimice identice. În plus,

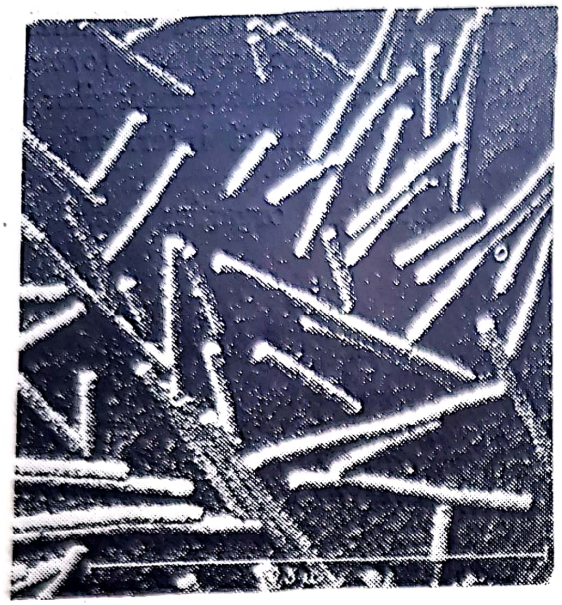


Fig. 5. Virusul mozaicului tutunului (microelectronografie, Colecţia Institutului Max Planck).

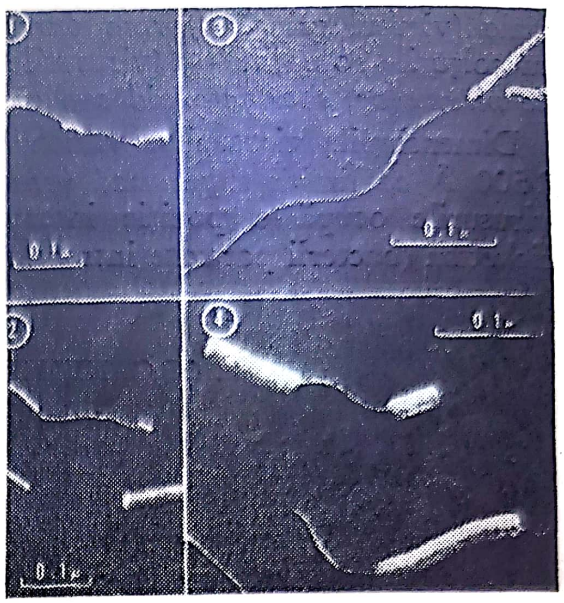


Fig. 6. Virusul mozaicului tutunului. Particulele virale prezintă degradări variate ale capsidei (*1—4*), care fac evidente structuri filamentoase corespunzînd ARN viral (după Carlisle).

dintre tipurile de simetrie cunoscute, numai două — simetria helicală şi cea cubică sau cvasicubică — permit împachetarea subunităţilor proteice în mod regulat sau cvasiregulat, în aşa fel încît — exceptînd contactele lor cu genomul viral — să aibă ambianţele lor chimice identice.

În sprijinul acestei concepţii pledează datele privind virusul mozaicului tutunului (VMT), al cărui genom (ARN) conţine aproximativ 6 000 de nucleotide. În cazul în care acest genom ar codifica un singur lanţ polipeptidic de 2 000 de aminoacizi, s-ar forma o proteină cu o greutate moleculară ($\sim 2{,}5 \times 10^5$) mult inferioară aceleia a învelişului proteic viral ($\sim 3{,}5 \times 10^7$). Datorită acestui fapt, chiar în cazul în care întreg genomul ar fi folosit pentru a codifica exclusiv proteină structurală (ceea ce în realitate nici nu se întîmplă), tot ar fi necesare circa 150 de molecule identice de proteină pentru capsida unui virion. Tipul de organizare prin dispoziţia simetrică a numeroase subunităţi identice are deci mari avantaje biologice, în primul rînd prin aceea că permite o importantă economie de material genetic. Într-adevăr, dacă proteina virusului ar consta dintr-o moleculă unică imensă, cantitatea de ADN necesară pentru a-i dirija sinteza ar fi atît de mare, încît ea nu ar putea fi inclusă în virion; în plus, construirea unei particule virale sferice sau în formă de bastonaş cu ajutorul unei singure molecule polipeptidice enorme ar fi foarte dificilă. Acest gen de structură complexă, pornind de la subunităţi identice, constituie prin urmare o modalitate eficientă de folosire a cantităţii limitate de material genetic reprezentat de acidul nucleic viral, modalitate care este în

același timp mai simplă și mai economică — știut fiind că în general este mai ușor să se producă în cantități mari orice structură complexă prin asamblarea unor structuri mai mici preformate decît pornind direct de la materia primă (prin analogie, este mai ușor să construiești un bloc din panouri prefabricate decît din cărămizi, nisip etc.). Cercetările ulterioare au arătat că virionii — particulele virale mature — sînt alcătuiți în general din următorii constituenți:

— *Genomul viral*, care este reprezentat în mod obișnuit printr-o moleculă de acid nucleic (fie ADN, fie ARN), cu greutate moleculară mare, liniară sau circulară, mono- sau bicatenară, împăturită sau înfășurată pentru a forma o structură compactă.

— *Capsida* (de la gr. *kapsa*=cutie), care acoperă genomul, reprezentat în forma sa cea mai simplă de un strat unic de molecule proteice identice așezate în mod regulat sau, alteori, de două sau mai multe straturi concentrice, fiecare putînd fi alcătuit dintr-un tip diferit de proteină.

Capsida și genomul viral formează *nucleocapsida* și reprezintă constituenții esențiali ai particulei virale. Materialul de bază pentru construcția capsidei este *unitatea structurală* care reprezintă cea mai mică unitate funcțională de construcție a capsidei și este formată fie dintr-un lanț polipeptidic, fie dintr-un agregat de lanțuri polipeptidice identice sau diferite. La virusurile cu simetrie helicală aceste unități sînt vizibile ca atare la microscopul electronic. La virusurile „sferice" (izometrice), unitățile structurale formează grămezi simetrice, vizibile la microscopul electronic, numite unități morfologice sau *capsomere* (de la gr. *meros*=parte) (Caspar și Klug). Folosind o terminologie mai simplă, Lwoff și Tournier (1967) consideră că la ambele tipuri de virusuri capsida este alcătuită din capsomere, cu diferența că la virusurile helicale capsomerele sînt formate dintr-o singură moleculă de proteină (ele sînt deci monomere și reprezintă unități structurale), pe cînd la virusurile izometrice sînt alcătuite din grupuri de 5—6 molecule (deci sînt oligomere și constituie unități morfologice). Numărul unităților structurale și morfologice din structura unui virus este controlat genetic și deci constant [1].

Un nivel mai complex de organizare corespunde virusurilor a căror nucleocapsidă este închisă într-o membrană sau un învelîș numit *peplos* (de la gr. *peplos*=manta), care, la rîndul său, este alcătuit din unități structurale speciale numite *peplomere*. Numărul peplomerelor este constant, fiind determinat de genomul viral, ceea ce explică mărimea constantă a virionului. Peplosul poate fi alcătuit numai din proteină virală *(homopeplos)* sau poate să conțină în plus și alți constituenți (lipide), derivați din membrana celulei-gazdă *(heteropeplos)*. La virusurile cele mai complicate structural (de exemplu, virusul

[1] Au fost propuse mai multe formule pentru calcularea numărului capsomerelor. După Horne, pentru virusurile icozaedrice (cu simetrie cubică) $N=10\ (n-1)^2+2$, în care N=numărul capsomerelor; n=numărul total al capsomerelor vizibile pe o muchie, inclusiv cele situate la extremitățile muchiilor. Exemple:

fagul $\Phi\times174$ $n=2$ $N=12$; poliomielită $n=3$ $N=42$;
herpes $n=5$ $N=162$; adenovirus $n=6$ $N=252$.

gripei) peplomerele servesc pentru fixarea unor molecule cu funcţie specială (hemaglutininele) şi formează un *diplopeplos* (alcătuit din două tipuri de molecule proteice de provenienţă virală), spre deosebire de peplosul simplu — descris anterior — constituit dintr-un singur tip de proteină virală — *haplopeplos*.

Semnificaţia biologică a constituenţilor virali:

— *genomul viral* poartă informaţia genetică necesară pentru propria sa replicare şi pentru devierea metabolismului celulei-gazdă în sensul sintezei celorlalţi constituenţi virali şi a precursorilor lor;

— *capsida* protejează materialul genetic, mărind astfel rezistenţa virusului în mediul extern şi infecţiozitatea lui;

— *peplosul* păstrează stabilitatea nucleocapsidei şi asigură fixarea virionului pe celulele-gazdă şi, prin aceasta, transmiterea lui eficientă, deci infecţia celulei-gazdă.

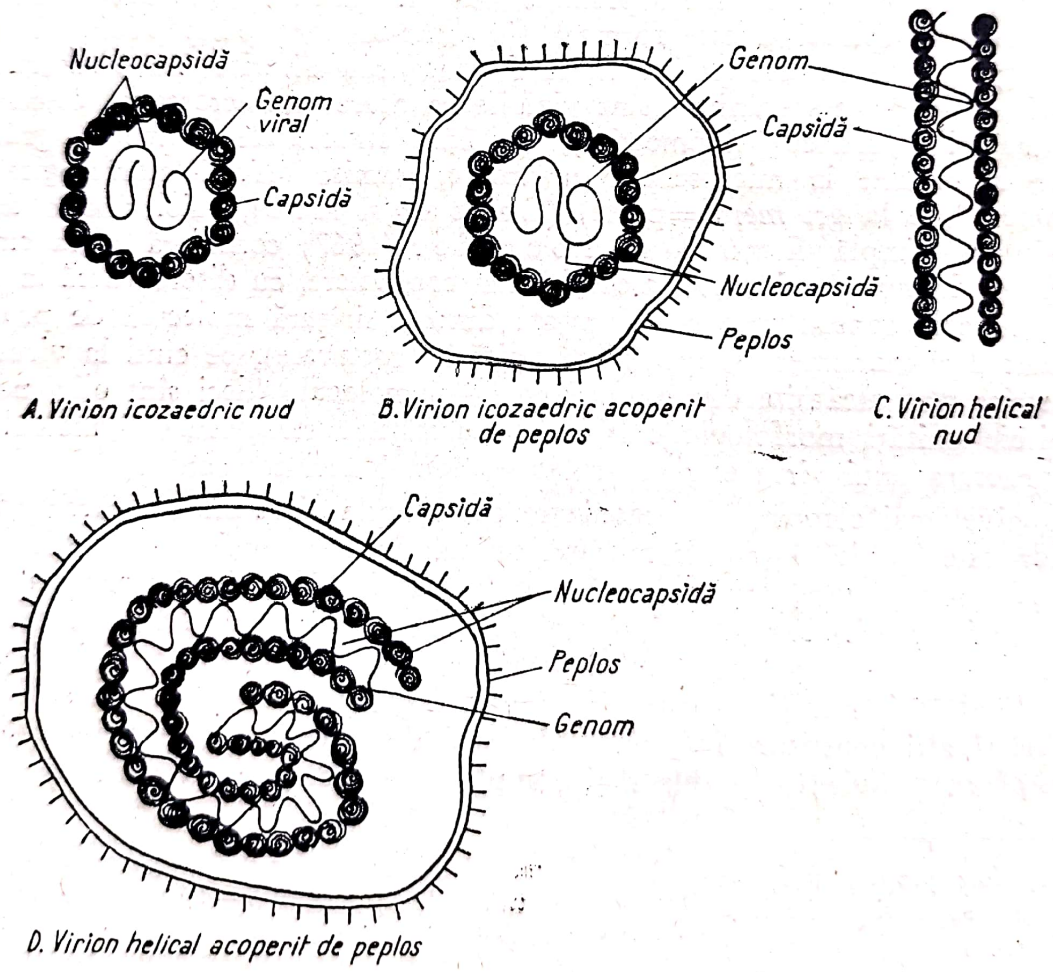


Fig. 7. Reprezentarea schematică a dispoziţiei constituenţilor virali în funcţie de tipul de simetrie a vironului (după Dulbecco).

5. SIMETRIA VIRUSURILOR

Orice structură ordonată constituită din unităţi identice, fie că este un cristal, fie că este o particulă virală, are un tip de simetrie bine definit, o anumită armonie de organizare rezultînd din modul de aşezare a părţilor constitutive şi din regularitatea proporţiilor acestora.

Simetria — aranjarea regulată şi repetată într-un ansamblu a unor structuri identice ca formă şi mărime, dispuse în jurul unui plan sau al unui ax — poate fi ilustrată prin diverse exemple luate din ambianţa curentă a omului, cum ar fi aranjarea regulată a plăcilor de gresie diferit colorate în pardoseala camerelor de baie sau faţadele unor construcţii ca blocurile de locuinţe. Un anumit tip de simetrie, simetria bilaterală sau simetria dintre drept şi stîng, este uşor de observat şi în alcătuirea animalelor superioare şi a corpului omenesc: mîna dreaptă reprezintă aproximativ imaginea în oglindă a mîinii stîngi, jumătatea dreaptă a feţei pe cea a jumătăţii stîngi, ş.a.m.d. O asemenea simetrie, evidentă din punct de vedere morfologic, nu se continuă însă şi la nivel molecular. În cazul virusurilor, moleculele de proteină care alcătuiesc capsida şi care de obicei sînt de acelaşi tip se grupează în mod ordonat, reproducînd în aranjarea lor trei tipuri de simetrie: *1) simetria helicală* (VMT, virusul gripal); *2) simetria cubică* sau *icozaedrică* (adenovirusuri, poliovirus, herpes); *3) simetria binală* sau *complexă* (bacteriofagi şi virusuri de tip variolă-vaccină).

a. Virusurile cu simetrie helicală

Numeroşi cercetători s-au preocupat de modul în care ar putea fi construită particula virală, respectiv de modul în care s-ar putea realiza asamblarea materialului de construcţie pentru a forma un virion. În acest scop s-a recurs la modele geometrice şi la mulaje, atît pentru construcţia subunităţilor, cît şi pentru asamblarea lor. Imaginea oferită de mulaje este însă pur convenţională, deoarece moleculele de proteine, din cauza structurii lor spaţiale, nu reprezintă obiecte geometrice cu margini perfect clar definite, iar proprietăţile lor de adaptare, adică de armonizare şi „montare" într-un ansamblu, nu depind de forma moleculei, ci şi de locali-

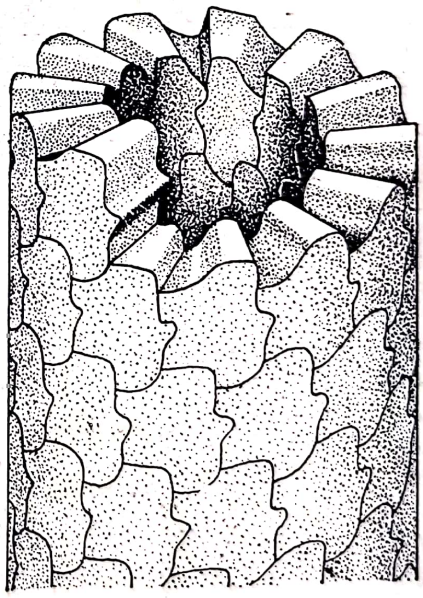


Fig. 8. Reprezentare schematică a modului de asamblare a unui virion cu formă cilindrică. Forma subunităţilor impune aşezarea lor ordonată — una lîngă alta — determinînd constituirea unei reţele care, prin pliere, formează un cilindru cu simetrie helicală (după Kellenberger)

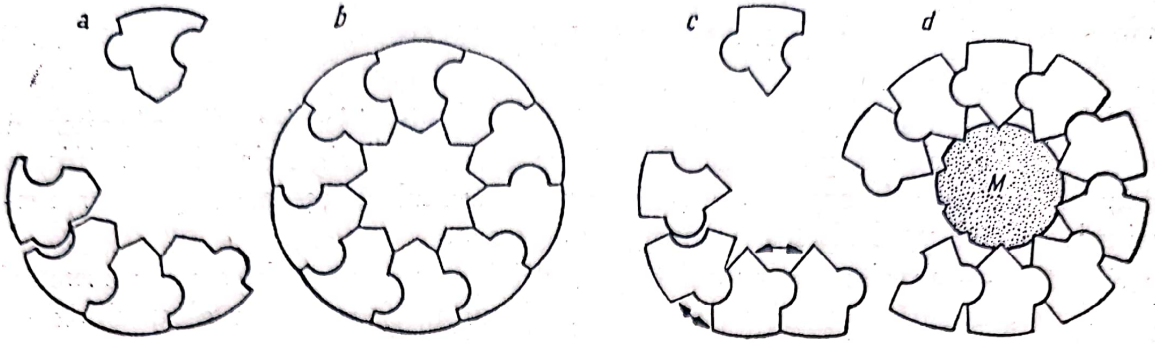


Fig. 9. Reprezentarea schematică a modului în care subunităţi identice (*a*) pot fi asamblate pentru a forma un inel (*b*), reprezentînd o secţiune transversală printr-un virion. În cazul unor unităţi care se potrivesc mai puţin (*c*) asamblarea lor dă naştere unor structuri mai flexibile, exceptînd cazul cînd ea se face pe un „miez" morfopoietic (*d*); după ce asamblarea s-a făcut, forma rămîne stabilă chiar dacă „miezul" (*M*) este îndepărtat (după Kellenberger).

zarea şi specificitatea legăturilor ei chimice. Cu alte cuvinte, ceea ce defineşte în realitate construcţia particulei virale este mai ales „potrivirea" stereochimică şi aceasta poate fi reprezentată printr-o formă regulată, geometrică, numai în mod arbitrar şi cu scop didactic.

Dintre virusurile cu simetrie helicală, cel mai bine studiat este VMT, la care înseşi subunităţile de construcţie — moleculele proteice — determină prin forma lor schema obligatorie de asamblare într-o capsidă cilindrică. Cu alte cuvinte, structura acestor subunităţi este de aşa natură, încît ele nu se pot uni în nici un alt mod în afară de acela care corespunde unei forme tubulare. Astfel de molecule proteice au fost considerate ca fiind în întregime determinante pentru forma cilindrică a capsidei şi ca avînd o capacitate riguroasă de adaptare în acest ansamblu. Capsidele virale construite din astfel de molecule sînt capabile de autoasamblare.

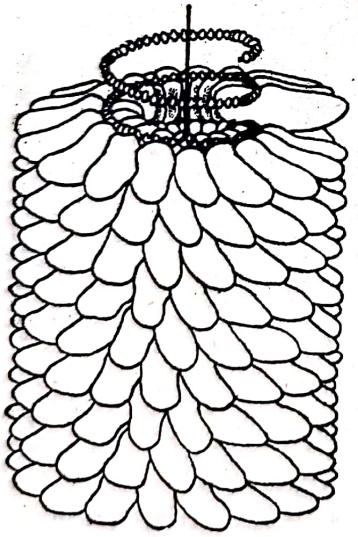


Fig. 10. Structura virusului mozaicului tutunului (reprezentare schematică). În zona centrală se vede ARN dispus helical şi înclavat între unităţile proteice ale virionului.

În cazul altor virusuri helicale mai complexe, subunităţile de construcţie mai puţin regulate au o capacitate de asamblare mai puţin riguroasă şi, ca urmare, simpla unire între ele a subunităţilor individuale ar forma o construcţie laxă, cu forme variabile şi mai puţin regulate. În aceste cazuri se presupune că asamblarea s-ar face pe un „sîmbure" morfopoietic care ar ţine locul de suport — ca o schelă— pentru aşezarea subunităţilor în grupări inelare succesive, pînă cînd capsida se formează în întregime. Se admite că după ce „inelele" de capsomere s-au constituit, acest mod de grupare persistă chiar dacă „sîmburele" iniţial este îndepărtat.

Virusul mozaicului tutunului (VMT). Particula virală (virionul) VMT are forma unui cilindru gol,

Fig. 11. Virusul mozaicului tutunului: microelectronografie după coloraţie negativă evidenţiind regiunea centrală goală a virionului şi aşezarea regulată a capsomerelor lui (după Naginton).

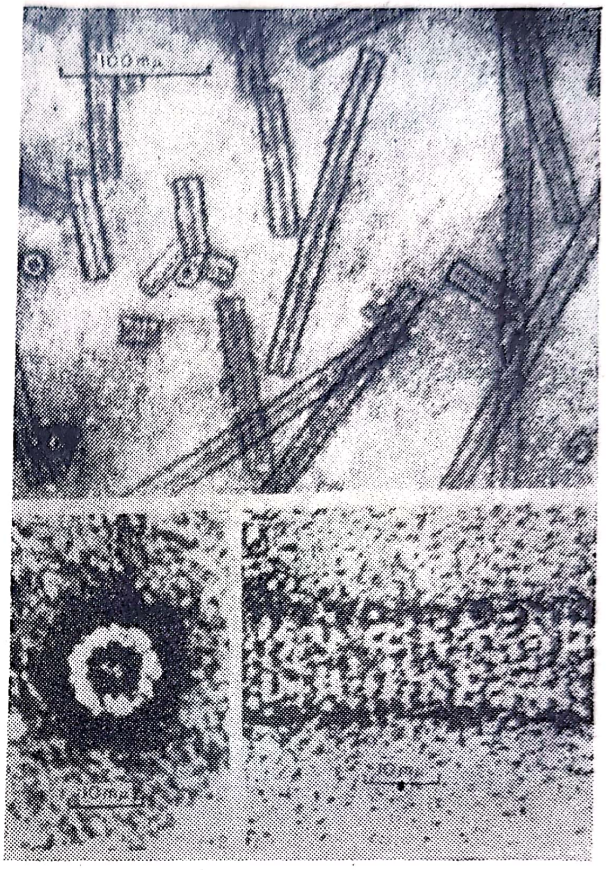


Fig. 12. Detaliu de structură a capsidei VMT evidenţiind porţiunea centrală goală a virionului şi striaţiunile transversale corespunzătoare aşezării helicale a subunităţilor de construcţie (după Nixon).

lung de circa 3 000 Å cu diametrul exterior de 170 Å şi cel interior de 40 Å. Această structură cilindrică rezultă din aranjarea simetrică (de tip helical) a 2 130 de subunităţi proteice identice, de formă elipsoidală (g.m. 18 000), alcătuite fiecare din cîte 158 de acizi aminaţi, într-o succesiune astăzi perfect cunoscută. Subunităţile proteice sînt aranjate în aşa fel încît 49 de molecule formează 3 tururi de spiră (circa $16^1/_3$ molecule de proteină pentru fiecare tur de elice). Materialul genetic este reprezentat de o moleculă de ARN răsucită sub forma unui lanţ helical, inclavat între subunităţile proteice şi formînd o elice de aceeaşi înălţime ca şi a acestora (23 Å) şi cu diametrul de 80 Å. Fiecare tur de elice al moleculei de ARN are 49 de nucleotide, ceea ce arată că fiecare subunitate de proteină corespunde la trei nucleotide. În felul acesta lungimea capsidei este determinată de lungimea ARN viral. Greutatea moleculară a virionului VMT este de $39{,}2 \times 10^6$.

Myxovirusurile. Unele virusuri considerate ca sferice pot avea o capsidă cu simetrie helicală, care poate fi văzută clar după îndepărtarea peplosului. Denumite astfel datorită afinităţii suprafeţei lor pentru mucoproteinele celulare,

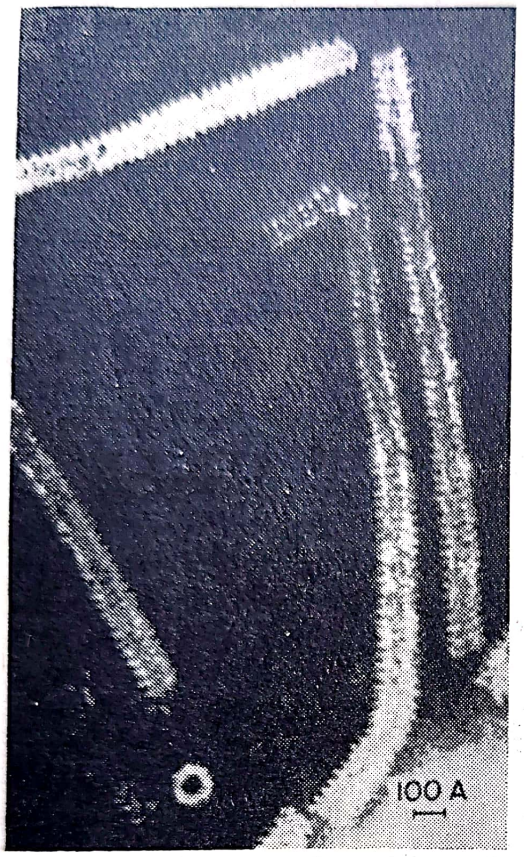


Fig. 11. Virusul mozaicului tutunului: microelectronografie după coloraţie negativă evidenţiind regiunea centrală goală a virionului şi aşezarea regulată a capsomerelor lui (după Naginton).

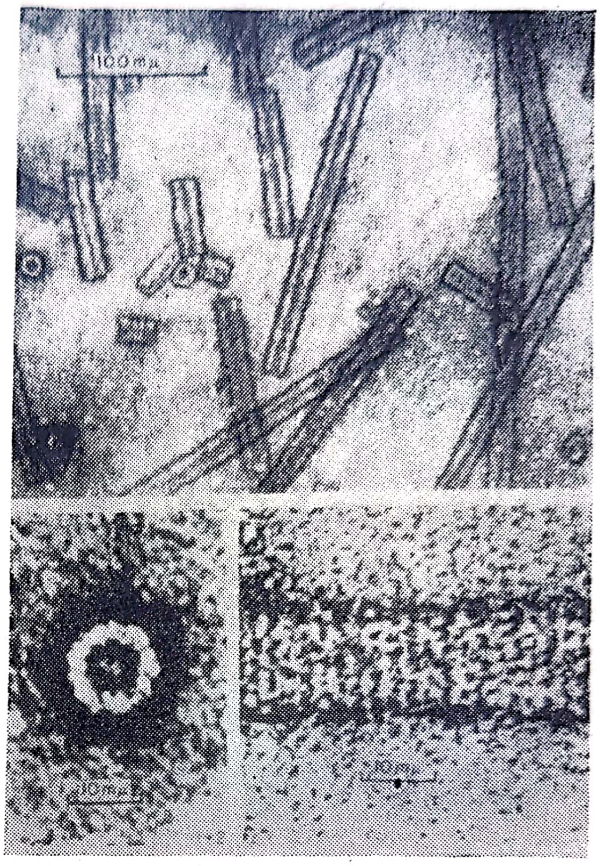


Fig. 12. Detaliu de structură a capsidei VMT evidenţiind porţiunea centrală goală a virionului şi striaţiunile transversale corespunzătoare aşezării helicale a subunităţilor de construcţie (după Nixon).

lung de circa 3 000 Å cu diametrul exterior de 170 Å şi cel interior de 40 Å. Această structură cilindrică rezultă din aranjarea simetrică (de tip helical) a 2 130 de subunităţi proteice identice, de formă elipsoidală (g.m. 18 000), alcătuite fiecare din cîte 158 de acizi aminaţi, într-o succesiune astăzi perfect cunoscută. Subunităţile proteice sînt aranjate în aşa fel încît 49 de molecule formează 3 tururi de spiră (circa $16^1/_3$ molecule de proteină pentru fiecare tur de elice). Materialul genetic este reprezentat de o moleculă de ARN răsucită sub forma unui lanţ helical, inclavat între subunităţile proteice şi formînd o elice de aceeaşi înălţime ca şi a acestora (23 Å) şi cu diametrul de 80 Å. Fiecare tur de elice al moleculei de ARN are 49 de nucleotide, ceea ce arată că fiecare subunitate de proteină corespunde la trei nucleotide. În felul acesta lungimea capsidei este determinată de lungimea ARN viral. Greutatea moleculară a virionului VMT este de $39{,}2 \times 10^6$.

Myxovirusurile. Unele virusuri considerate ca sferice pot avea o capsidă cu simetrie helicală, care poate fi văzută clar după îndepărtarea peplosului. Denumite astfel datorită afinităţii suprafeţei lor pentru mucoproteinele celulare,

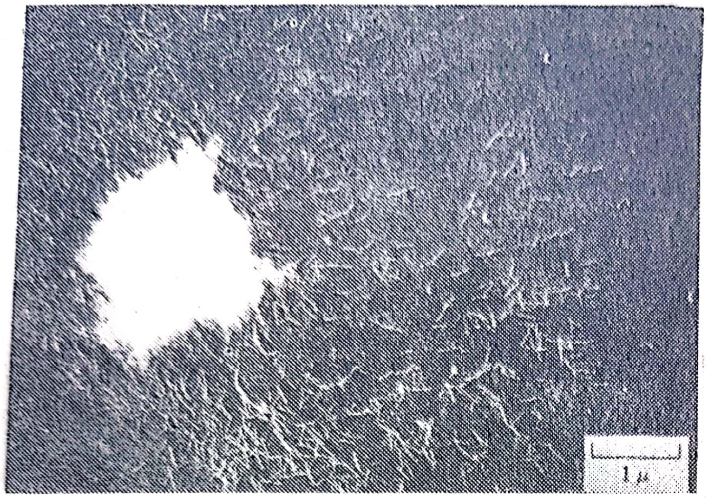


Fig. 13. Celulă dezintegrată provenită dintr-un perişor de pe o plantă de tutun bolnavă de mozaic, liberînd un număr mare de particule virale (după Williams).

mixovirusurile formează un grup de virusuri relativ polimorfe, alcătuit din mai mulţi reprezentanţi: virusul gripei umane (influenza), al gripei porcine, al bolii Newcastle etc.

Forma lor obişnuit-sferică, al cărei diametru variază între 800 şi 1 200 Å, este determinată de prezenţa unui înveliş extern — o „membrană" limitantă, groasă de aproximativ 80—100Å — în interiorul căruia se găseşte înfăşurată strîns nucleocapsida ribonucleoproteică (ARN + proteină) cu structură helicală şi cu un diametru de circa 90—100 Å.

Lungimea exactă a helicei nu este cunoscută, deoarece nucleocapsida se fragmentează în cursul izolării. Faptul că uneori s-au izolat fragmente de ARN mai lungi de 1μ sugerează că ar fi posibil ca tot ARN viral (care la

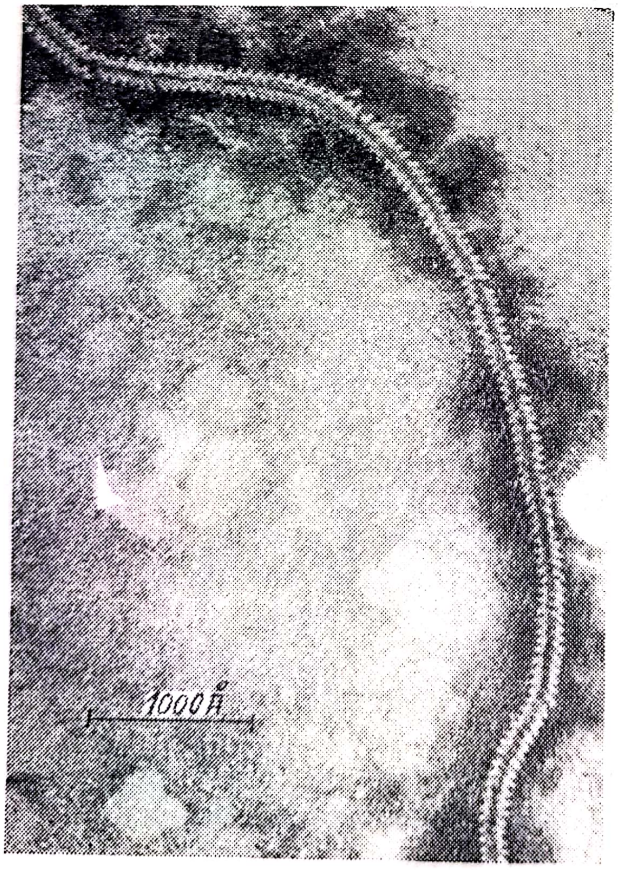
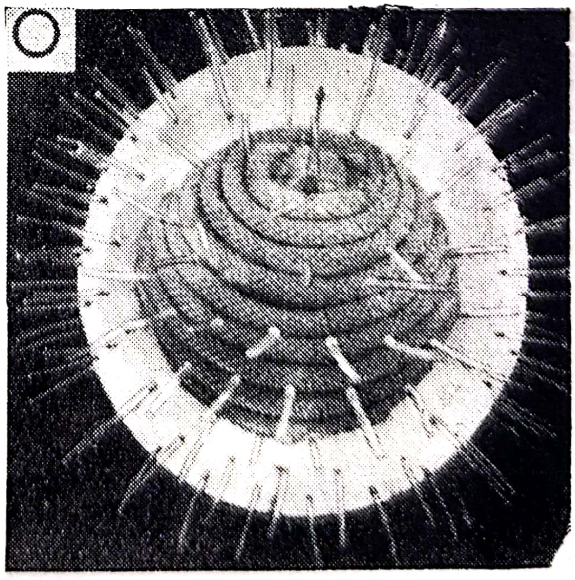


Fig. 14. Nucleocapsida virusului rugeolei: microelectronografie evidenţiind organizarea de tip helical (după Waterson).

Fig. 15. Model de structură a virusului gripal (după Horne).



virusul gripal are g.m. de 2×10^6 daltoni/virion) să fie dispus într-un singur filament.

De pe suprafaţa externă a învelişului lipomucoproteic viral (peplos), derivat din fragmente ale membranei nucleare sau citoplasmice ale celulei-gazdă, pornesc formaţiuni filamentoase lungi de 80—100 Å şi cu diametru de 30—40 Å, aşezate regulat şi la distanţe egale, reprezentînd *hemaglutininele*, care au rol important în fixarea virusului pe celulele sensibile. Între locurile de inserţie ale acestor formaţiuni se găsesc aşezate grupat moleculele de neuraminidază, enzimă care clivează specific acidul *N*-acetil neuraminic din constituţia membranei celulare, favorizînd astfel pătrunderea sau liberarea virusului din celulă.

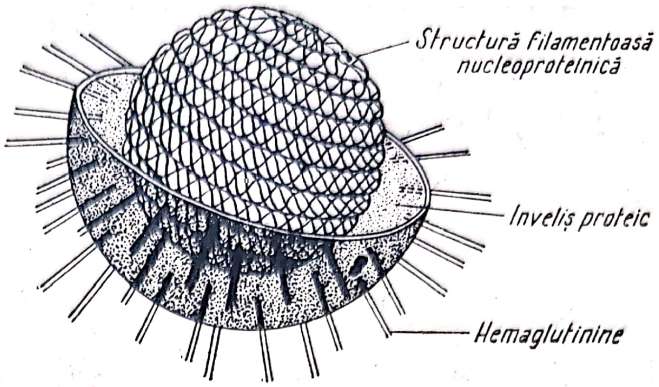


Fig. 16. Secţiune printr-o particulă de virus gripal evidenţiind aşezarea helicală a nucleocapsidei, învelişul extern şi hemaglutininele (reprezentare schematică după Horne).

În compoziţia chimică a myxovirusurilor s-au găsit 60—70% proteine, 1—5% ARN, 3—8% glucide (polimeri de galactoză, manoză, fucoză şi aminohexoză) şi 18—37% lipide. Glucidele (exceptînd riboza, constituent normal al ARN) şi lipidele reprezintă în cea mai mare parte compuşi prezenţi în celula-gazdă anterior infecţiei virale, dar încorporaţi în virion în timpul morfogenezei lui.

b. Virusurile cu simetrie icozaedrică

Cercetările de microscopie electronică au arătat că virusurile descrise ca „sferice" au în realitate un contur hexagonal datorită capsidei lor poliedrice constituită dintr-o proteină cu un înalt grad de organizare. Studiile de chimie asupra unor virusuri sferice mici fitopatogene au confirmat supoziţia după care capsida lor ar fi formată din molecule identice de proteină. În schimb, cercetările de microscopie electronică pe particule virale din grupa virusurilor sferice nu au adeverit deducţiile teoretice ale lui Crick şi Watson, care considerau că învelişul acestor virioni ar fi obligatoriu alcătuit din 60 (sau multiplu de 60) de unităţi asimetrice situate în jurul axelor de simetrie.

Virionii „sferici" sînt într-adevăr constituiţi din structuri asimetrice aşezate în jurul axelor de simetrie, dar numărul acestor structuri este diferit de 60 sau multiplu de 60. Explicaţia divergenţelor relativ la structura virusurilor sferice rezidă în faptul că, spre deosebire de VMT, la aceste virusuri unităţile morfologice vizibile la microscopul electronic — capsomerele — nu sînt echivalente cu subunităţile chimice de construcţie, ci sînt alcătuite fiecare din cîte 5 sau 6 subunităţi chimice. Ca urmare, regiunile din jurul fiecărei subunităţi şi legăturile cu vecinele sale nu sînt exact identice, ci aproximativ echivalente sau cvasiechivalente (Caspar şi Klug, 1962).

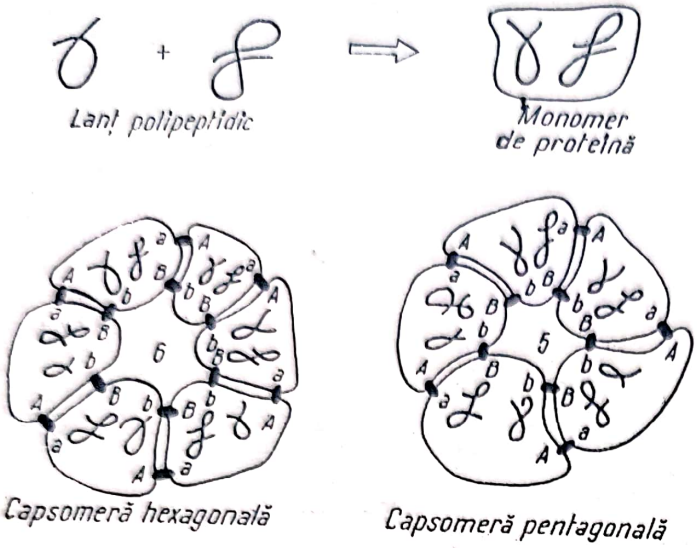


Fig. 17. Structura capsidei virale (după Caspar și Klug): unitățile de structură ale capsidei, reprezentate prin monomere de proteină, sînt alcătuite din unul sau mai multe lanțuri polipeptidice (în diagrama de sus, din două lanțuri). În capsidele icozaedrice monomerele sînt grupate în capsomere, care sînt oligomere de cîte 5 sau 6 monomere. Gruparea se realizează prin legarea fiecărui monomer cu alte două monomere vecine, prin același tip de legături chimice (*A-a* și *B-b*).

Conturul hexagonal foarte regulat al virusurilor sferice, așa cum apare la microscopul electronic, sugerează ideea că forma lor ar fi apropiată de aceea a unui solid cu toate fețele identice, cu laturile și unghiurile egale.

Din cele 5 solide euclidiene care răspund acestor condiții și anume tetraedrul, cubul, octaedrul, dodecaedrul și icozaedrul, cel din urmă dă un profil hexagonal în cele mai multe orientări. În sprijinul concepției că virusurile sferice ar avea acest tip de simetrie, pledează datele lui Williams și Smith, care au demonstrat că umbrele proiectate de un icozaedru pe suprafața plană pe care e așezat, corespund exact imaginii electronice a virusului *Tipula iridescent* (patogen pentru larvele mai multor specii de insecte), umbrit prin metalizare.

Ulterior, simetria icozaedrică a fost pusă în evidență și la alte virusuri, ca virusul nanismului tomatelor *(bushy stunt)*, adenovirusuri virusul polio, virusul herpesului etc.

Probleme legate de modul de construcție al virionilor icozaedrici. Descoperirea simetriei icozaedrice a virionilor „sferici" ridică o serie de probleme privind modul în care poate fi construită o astfel de structură. În legătură cu aceasta s-au făcut o serie de ipoteze, fără ca pînă astăzi să se fi ajuns la o concepție unitară.

Microscopia electronică a demonstrat în cazul virusurilor din această categorie, existența a două tipuri de capsomere avînd respectiv 5 și 6 laturi *(pentoni* și *hexoni)*, rezultînd, la rîndul lor, din aranjarea simetrică a unor subunități de construcție mai mici. Problema construcției particulei virale constă deci în a identifica modul în care capsomerele de formă pentagramică și hexagramică se pot aranja simetric pentru a acoperi o suprafață închisă, alcătuind un fel de cutie icozaedrică.

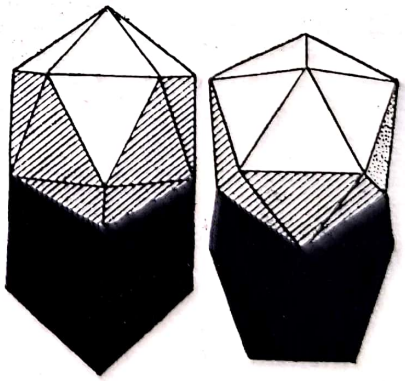


Fig. 18. Reprezentare schematică a formei umbrelor date de două modele icozaedrice iluminate sub un unghi de 35°: *stînga* — icozaedru iluminat pe un vîrf; *dreapta* — icozaedru iluminat pe o muchie.

Încercînd să explice această construcţie, Caspar şi Klug (1962) au recurs la unul dintre principiile de geometrie aplicate de arhitectul Buckminster Fuller în construcţia domului geodezic. În proiectul de plan (realizat în construcţie), pentru cupola domului Fuller a făcut o subdiviziune a suprafeţei unei sfere în faţete triunghiulare echilaterale, în raporturi cvasiechivalente, aranjate după o simetrie icozaedrică. Acest procedeu de triangulare a sferei oferă dispozitivul optim pentru formarea unei cutii închise, construită din unităţi de structură identice, legate în mod regulat. Un grad comparabil de cvasiechivalenţe nu poate fi realizat prin nici un alt model de subdivizare a suprafeţei unei sfere. Icozaedrul reprezintă astfel forma cea mai economică în care o cantitate de proteine identice pot fi aranjate simetric pentru a crea acidului nucleic un înveliş protector *închis*.

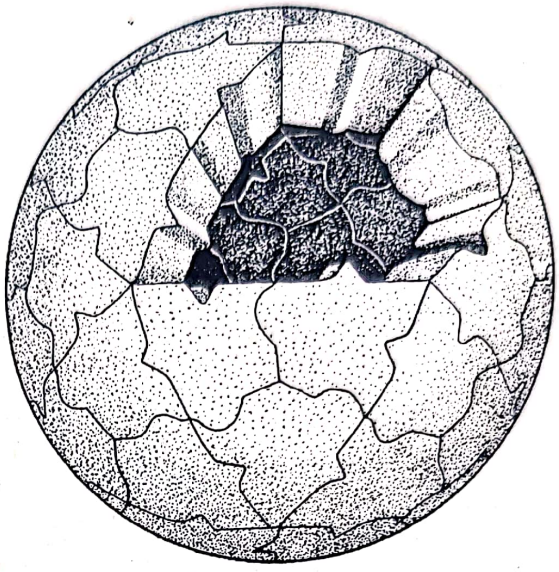


Fig. 19. Model de structură a unui virus sferic format din 60 subunităţi de construcţie identice, determinante de formă, aranjate în pentamere. În figură, cinci subunităţi au fost îndepărtate pentru a face mai evidentă structura modelului (după Kellenberger).

Icozaedrul este un poliedru regulat avînd 20 de feţe — toate triunghiuri echilaterale — 30 de creste şi 12 vîrfuri (în fiecare vîrf se întîlnesc 5 feţe ale poliedrului. El prezintă cel mai înalt tip de simetrie — caracterizat ca fiind de tip 5 : 3 : 2, întrucît are:

a) 6 axe de simetrie rotaţională de ordinul 5, reunind 2 vîrfuri opuse ale icozaedrului. Dacă modelul este privit de-a lungul uneia dintre aceste axe în jurul căreia este rotat, există

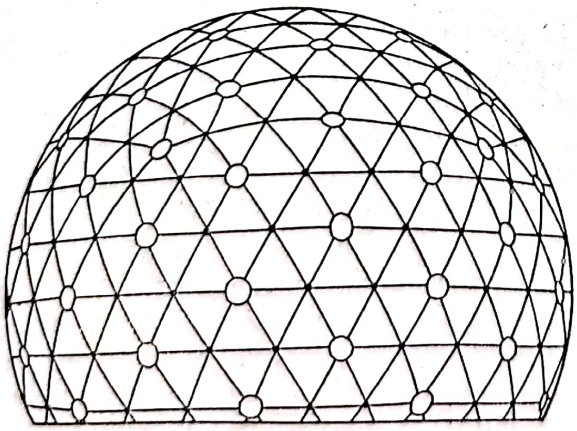


Fig. 20. Reprezentare schematică a domului geodezic al lui Fuller. Suprafaţa lui este alcătuită din faţete triunghiulare cvasiechivalente, grupate în hexamere sau în pentamere în jurul unor suprafeţe circulare mici.

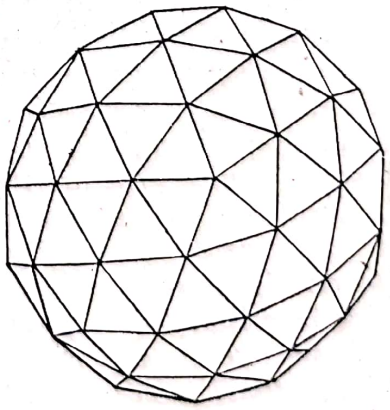


Fig. 21. Reprezentarea unei reţele de suprafaţă cu simetrie icozaedrică pe o sferă geodezică explicînd forma „sferică" a virusurilor cu acest tip de simetrie (după Klug).

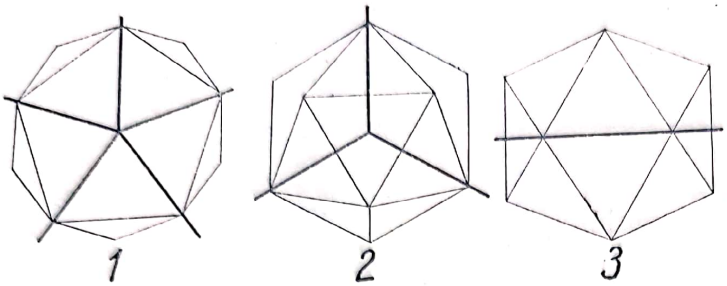


Fig. 22. Axele de simetrie ale unui icozaedru de tip regulat:

1 — axele de simetrie de tip 5; *2* — axele de simetrie de tip 3; *3* — axul de simetrie de tip 2.

5 poziţii în care are un aspect identic (o rotaţie de $\frac{2\pi}{5}$ în jurul axului de ordinul 5 face ca figura să coincidă cu ea însăşi).

b) 10 axe de ordinul 3 reunind centrii a 2 feţe opuse (o rotaţie de $\frac{2\pi}{3}$ în jurul oricărui din acest ax dă un aspect identic — deci, privit de-a lungul acestor axe, solidul are un aspect identic în 3 poziţii).

c) 15 axe de simetrie de tip 2, reunind mijlocul a 2 creste opuse. Privit de-a lungul lor poliedrul are un aspect identic în 2 poziţii (corespunzînd unei rotaţii de $\frac{2\pi}{2}$ în jurul axului).

Virusurile sferice prezintă o simetrie de ordinul 5 : 3 : 2, pentru că părţile lor constituente — capsomerele — stau *pe* sau *în jurul* axelor de simetrie de tip 5 : 3 : 2 ale unui icozaedru. Pentru înţelegerea simetriei de tip 5 : 3 : 2 amintim următoarele exemple observate frecvent în jurul nostru: *a)* simetria de ordinul 5 este cea mai frecventă la flori. Astfel, florile de măr, care au 5 petale identice, prezintă un ax de simetrie de *tip 5*, care trece prin centrul fiecărei flori. Dacă floarea este privită de-a lungul acestui ax şi este rotită în jurul lui există 5 poziţii în care ea are un aspect identic (acest tip de simetrie este întîlnit destul de des şi la unele animale inferioare); *b)* tripiedul unui aparat fotografic are un ax de simetrie de *tip 3*, care trece prin punctul de joncţiune al celor 3 picioare aşezate simetric; *c)* o scară în formă de spirală prezintă o simetrie rotaţională de *tip 2* în jurul axului său central, corespunzînd simetriei helicale (spiralate), prin faptul că fiecare treaptă are o relaţie constantă cu vecinele ei.

În ipoteza lui Caspar şi Klug (1962) se consideră că acest dispozitiv de construcţie a învelişului proteic al virionului este determinat de proprietăţile de legare specifică ale unităţilor moleculare identice din care acesta este construit. Aşezarea regulată rezultă din faptul că unităţile de structură se leagă în mod specific şi de aceea sînt asociate în mod regulat, ceea ce determină formarea unei structuri stabile. Legarea specifică a unor unităţi identice duce la formarea unei structuri simetrice, deoarece există numai un număr limitat de căi în care o anumită unitate poate fi legată cu vecinele sale pentru a forma un număr maxim de legături stabile. Cea mai simplă situaţie este aceea întîlnită la cristale, care apar ca o reţea periodic tridimensională, în care fiecare unitate este în raporturi echivalente cu vecinele sale. În cazul particulelor virale, toate moleculele, deşi identice, nu sînt în raporturi exact echivalente, ci numai aproximativ echivalente sau cvasiechivalente.

Figura 23 *A* sugerează o modalitate de construcţie a unui virus icozaedric prin subîmpărţirea fiecărei faţete din cele 20 ale particulei, într-un număr de triunghiuri echivalente egale şi plasarea subunităţilor de construcţie la vîrfurile acestor triunghiuri mici ca într-un mozaic.

Bazat în mare parte pe concepţia lui Caspar şi Klug, Kellenberger consideră că subunităţile identice legate între ele în poziţii specifice pentru a reconstitui un icozaedru trebuie obligatoriu să fie aşezate după un model regulat, care poate fi asemănat cu suprafaţa unui cristal. El consideră că subunităţile de construcţie — reprezentate în figura 23 *A* cu o formă arbitrară — ar forma o reţea hexagonală în care se deosebesc unităţi de construcţie dispuse în grupuri de cîte 6 (hexamere) şi cîte 3 (trimere). Dacă presupunem că dintr-un astfel de model regulat se scoate un sector de 60°, marginile rămase libere se apropie şi se unesc (pentru că se potrivesc una cu alta exact ca înainte), formînd un con la al cărui vertex, un hexamer, a fost înlocuit cu un pentamer (fig. 23 *B*)[1].

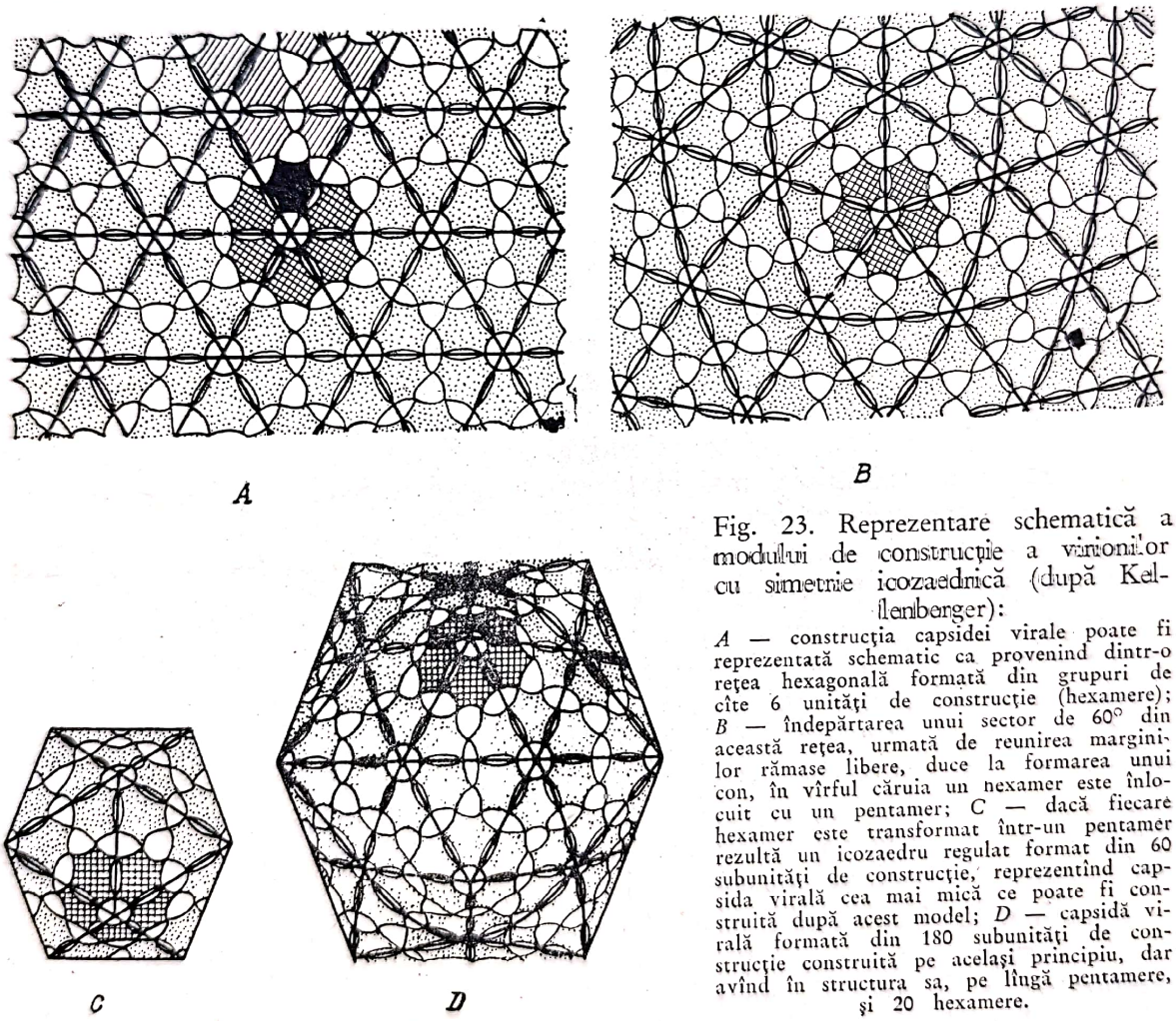


Fig. 23. Reprezentare schematică a modului de construcţie a virionilor cu simetrie icozaedrică (după Kellenberger):

A — construcţia capsidei virale poate fi reprezentată schematic ca provenind dintr-o reţea hexagonală formată din grupuri de cîte 6 unităţi de construcţie (hexamere); *B* — îndepărtarea unui sector de 60° din această reţea, urmată de reunirea marginilor rămase libere, duce la formarea unui con, în vîrful căruia un hexamer este înlocuit cu un pentamer; *C* — dacă fiecare hexamer este transformat într-un pentamer rezultă un icozaedru regulat format din 60 subunităţi de construcţie, reprezentînd capsida virală cea mai mică ce poate fi construită după acest model; *D* — capsidă virală formată din 180 subunităţi de construcţie construită pe acelaşi principiu, dar avînd în structura sa, pe lîngă pentamere, şi 20 hexamere.

[1] În mod similar, scheletul de siliciu al radiolarului *Aulonia hexagona* descris de Haeckel pare să prezinte un model hexagonal aproape regulat, îmbrăcat peste o sferă. Examenul atent arată însă că unele dintre ochiurile reţelei de siliciu de la *Aulonia* nu sînt hexagrame, ci pentagrame. În conformitate cu o formulă fundamentală a topologiei (referitoare la partiţia arbitrară a unei sfere în regiuni care se mărginesc una pe alta după anumite linii) este imposibil ca o reţea hexagonală să acopere o sferă. Nevoia de unităţi pentagonale pentru construcţia unui înveliş închis este deci absolută (fig. 24).

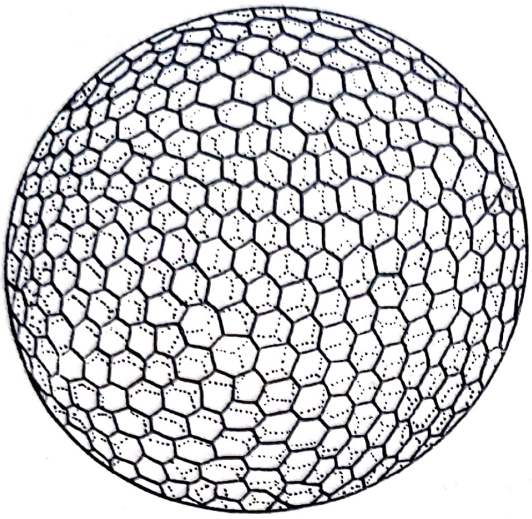


Fig. 24. Scheletul de siliciu al radiolarului *Aulonia hexagona* avînd aspectul unui model hexagonal îmbrăcat peste o sferă. Printre ochiurile hexagonale ale rețelei sînt intercalate pentagoane — fără de care o rețea hexagonală nu poate acoperi o sferă.

Rezultă pentru ansamblul icozaedrului două tipuri de desene: unul hexagonal, corespunzînd unităților plasate pe fețe și pe muchiile triunghiurilor — care sînt situate la distanță egală de 6 obiecte vecine — și unul pentagonal, corespunzînd celor așezate la vîrfuri, care sînt echidistante numai față de 5 obiecte înconjurătoare.

În cazul în care fiecare hexamer este transformat într-un pentamer rezultă cel mai mic virus de acest tip, un icozaedru regulat cu 60 de subunități (fig. 23 *C*). Cînd transformarea se face numai în 10 localizări rezultă un virus format din 20 hexamere și 10 pentamere situate la vîrfuri (120 de subunități) (fig. 23 *D*).

Se admite că în cazul virusurilor foarte mici subunitățile ar fi astfel construite, încît ar putea determina prin însăși structura lor forma de asamblare necesară pentru a forma o capsidă. În schimb, capsidele mai mari nu sînt perfect simetrice. Așezarea subunităților de construcție în raporturi cvasiechivalente face posibilă asamblarea unui număr redus de subunități mai mari într-o capsidă ceva mai deformată, dar păstrînd simetria icozaedrică.

Raportul dintre genom și capsidă la virusurile icozaedrice. Simetria helicală descrisă la VMT permite, după cum am arătat, o interacțiune extrem de regulată între genomul constînd din ARN monocatenar și subunitățile proteice ale capsidei. La virusurile icozaedrice, raportul spațial dintre acidul nucleic și proteină este mai greu de explicat. Este posibil ca molecula de ARN, mai flexibilă, să fie înfășurată în interionul capsidei ca un ghem de sîrmă, deși unele date sugerează că această pliere nu s-ar face întîmplător, ci în relație cu structura capsidei. În cazul cînd acidul nucleic este ADN dublu helical, care nu poate fi „înfășurat" ușor, el s-ar plia probabil numai în anumite puncte determinate ale secvenței sale de baze.

Principalele virusuri cu simetrie icozaedrică:

Adenovirusurile reprezintă un grup de virusuri care pot infecta tractul respirator și digestiv al omului și animalelor. Unele tulpini au proprietatea de a induce formarea de tumori la animale. Virionul are un diametru de 700 Å. Horne a stabilit aranjarea subunităților structurale în particule de virus după simetria icozaedrică prin crearea unui model constituit din mingi de tenis de masă aranjate după imaginea electronooptică a virusului. Virionul este format din proteină și 11—14% ADN (10^7 daltoni).

Poliovirusurile reprezintă agenții patogeni ai poliomielitei și ai unor boli înrudite cu aceasta. Virionul are diametrul de 280 Å și greutatea moleculară

de $6,7 \cdot 10^6$. Capsida cu simetrie icozaedrică este alcătuită din 32 de capsomere foarte mici, relativ sferice, alcătuite la rîndul lor din 60 de subunităţi de aproximativ 60—65 Å. Genomul viral aranjat în interiorul capsidei alcătuieşte 20—25% din particulă şi este format din ARN cu greutate moleculară 2×10^6, suficient pentru a codifica sinteza a 8—10 proteine, dintre care două sînt structurale (capsidale), iar restul sînt implicate în dirijarea metabolismului celulei-gazdă.

Herpesvirusul este agentul infecţios care determină leziunea cutanată denumită herpes. Diametrul global al particulei virale este cuprins între 1 450 şi 2 050 Å (în medie 1 800 Å) datorită unui peplos — derivat în cea mai mare parte din celula-gazdă — cu aspect de membrană bilamelară groasă de 40—180 Å, bogată în lipide; peplosul are un rol important în infecţiozitatea virusului.

Materialul genetic este reprezentat de o moleculă unică de ADN bicatenar ($1,1—1,4 \times 10^{-10}$ μg ADN/virion), închis în interiorul unei capside cu diametrul de $1\,050 \pm 10$ Å.

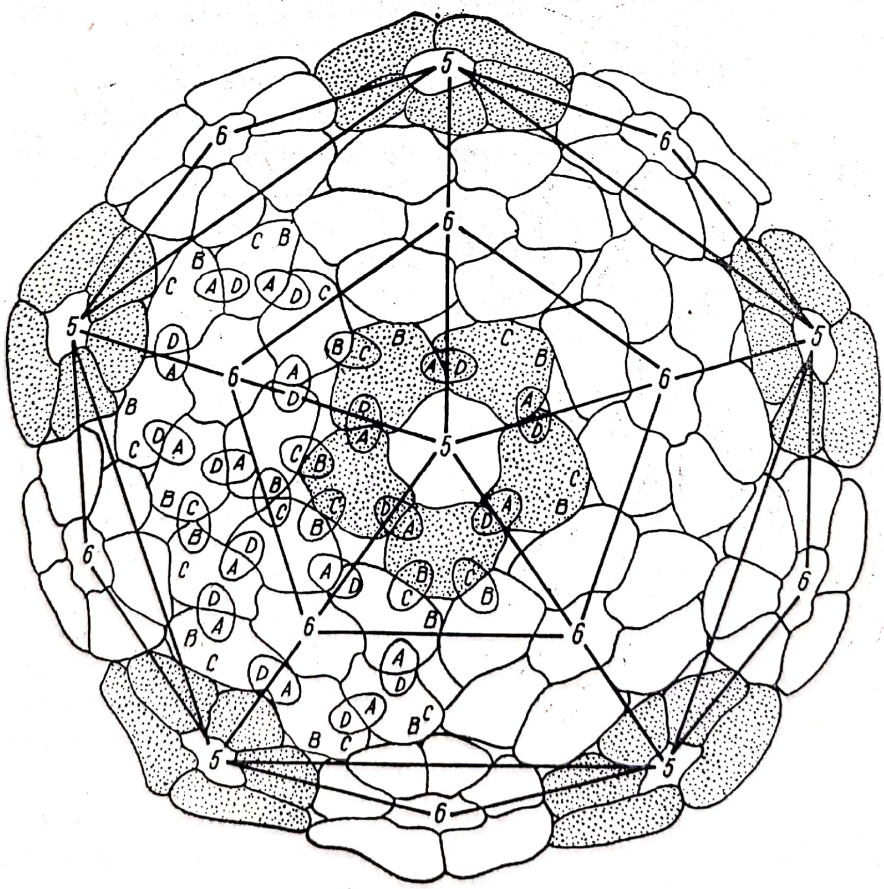


Fig. 25. Asamblarea capsomerelor pentru a forma o capsidă icozaedrică (după Dulbecco). Icozaedrul prezentat are 24 capsomere alcătuite din monomere identice; 12 capsomere sînt pentamere (*5*), iar 30 sînt hexamere (*6*). Legăturile chimice ipotetice dintre unităţile aceleiaşi capsomere sînt notate *AD*, iar cele dintre capsomere, *BC*.

Scanned with OKEN Scanner

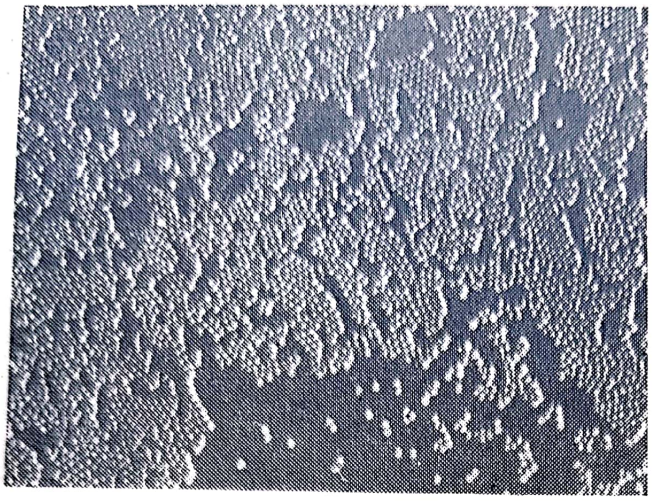


Fig. 26. Virusul poliomielitei (microelectronografie)

Proiectată pe un plan, capsida apare fie ca un hexagon fie ca o formă geometrică aproape circulară (în realitate ca un decagon). Aceste aspecte diferite corespund proiecţiei plane a unui icozaedru regulat văzut după axe de simetrie diferite.

În alcătuirea capsidei intră 162 de capsomere, formate la rîndul lor din 960 de subunităţi structurale asimetrice. Capsomerele aşezate la vîrfurile icozaedrului (în număr de 12) au aspectul unor prisme goale, alcătuite din 5 subunităţi corespunzînd celor 5 pereţi ai prismei, iar cele aşezate pe feţele şi pe crestele icozaedrului sînt prisme hexagonale alcătuite din 6 subunităţi. Nevoia de unităţi pentagonale este riguroasă, întrucît este imposibil să se formeze un spaţiu închis prin aranjarea unui sistem de hexagoane. Adăugarea unităţilor pentagonale permite acest lucru, după cum se demonstrează în natură şi prin structura radiolarilor. Indiferent de forma lor, capsomerele au un diametru de 95 Å şi o înălţime de 120—125 Å, iar canalul lor axial central are un diametru de 40 Å.

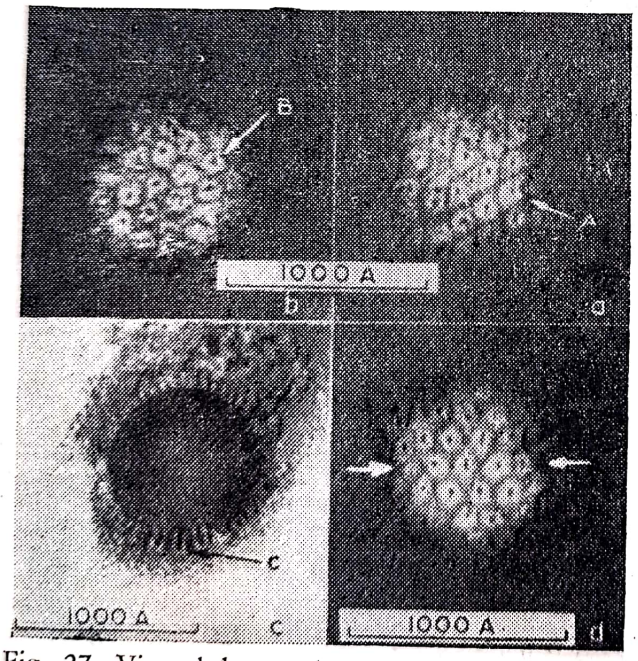


Fig. 27. Virusul herpesului. Capside în care se evidenţiază o capsomeră pentagonală înconjurată de alte cinci (*a*) şi o capsomeră hexagonală înconjurată de alte şase capsomere (*b*); *c*-capsidă „goală". La periferia ei, capsomere tubulare alungite, aşezate radiar; zonele întunecate corespund spaţiilor goale în care a pătruns substanţa de contrast; *d*-capsidă în care se observă gruparea hexagonală a capsomerelor (după Wildy).

Capsida herpesvirusului este acoperită de un peplos din care pornesc formaţiuni filamentoase de natură proteică. Ea are greutatea moleculară 80 milioane, subunităţile structurale (alcătuite probabil din cîte o moleculă proteică) au circa 80 000

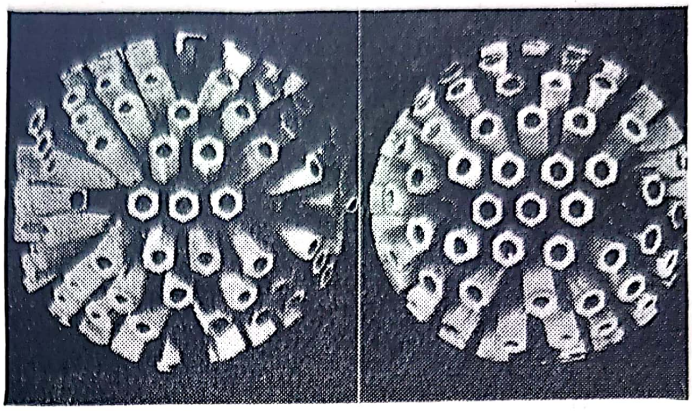


Fig. 28. Modele de structură ale herpesvirusului construite din 150 prisme hexagonale şi 12 prisme pentagonale corespunzînd capsomerelor virale (după Wildy).

iar o capsomeră aproximativ 500 000 avograms. Masa totală a particulei (cu înveliş) corespunde la 7—8 sute de milioane avograms.

În preparatele observate la microscopul electronic, pe lîngă virionii obişnuiţi (cu peplos) se mai văd şi forme „nude" (fără înveliş extern), precum şi forme „golite" (fără ADN). Se presupune că ADN ar putea ieşi din capsidă prin cavităţile capsomerelor, pentru a pătrunde în celula-gazdă pe care o infectează.

În afară de ADN şi proteină, acest virus mai conţine fosfolipide şi glucide.

c. Virusurile complexe

Virusul vaccinei (grupul Pox). Ultrastructura celui mai mare şi mai complex dintre virusurile vertebratelor a fost foarte mult studiată, dar natura diferitelor structuri şi semnificaţia lor fac încă obiectul unor controverse. Virusul vaccinei are forma unei cărămizi cu colţurile rotunjite şi dimensiunile de 2 000—2 500 Å × ×2 500—3 200 Å (gr. mol. de 5.5×10^{-9} μg sau 5.5×10^{-15} μg). Cu ajutorul tehnicilor speciale de microscopie electronică pe secţiuni ultrafine şi prin degradarea controlată a diferitelor structuri s-a demonstrat că acest virus este alcătuit din: *a) un înveliş extern* lipoproteic situat la periferia virionului şi avînd o structură dublu laminată; *b) un disc biconcav*

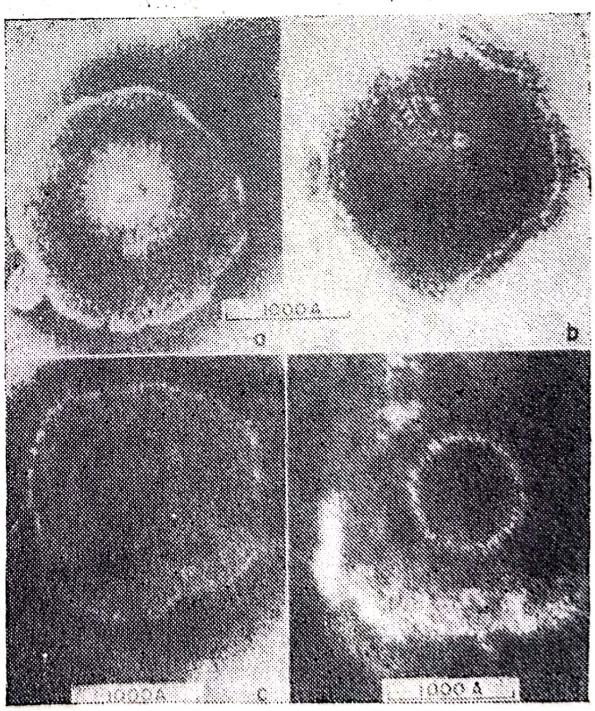


Fig. 29. Morfologia herpesvirusului: Se observă patru particule virale (*a*, *b*, *c*, *d*), acoperite de peplos provenite din culturi pe celule *HeLa* (după Wildy).

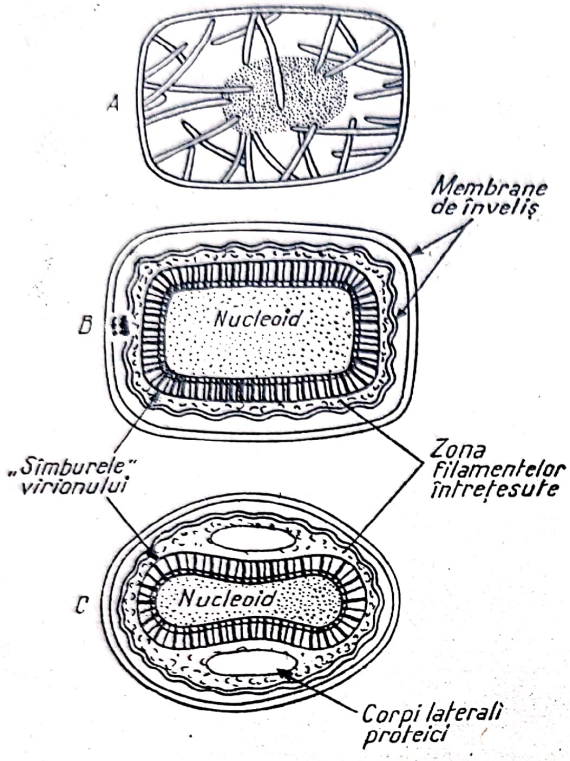


Fig. 30. Reprezentare schematică a virusului vaccinal (grupul *Pox*):

A — aspectul suprafeţei virionului; *B* — secţiune frontală; *C* — secţiune transversală.

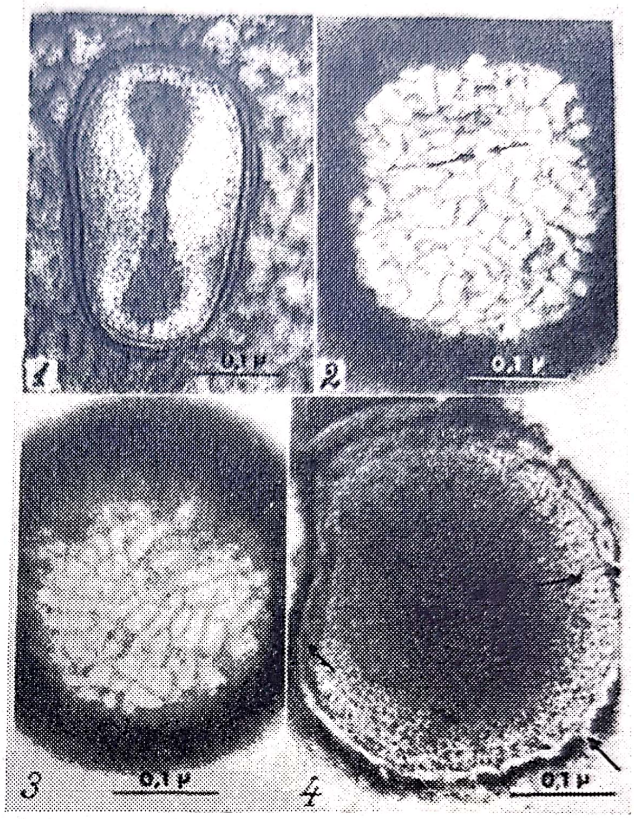


Fig. 31. Detalii de structură ale virusurilor din grupul *Pox:*

1 — nucleoid; *2* şi *3* — aspectul suprafeţei virionului; *4* — aspectul virionului după pătrunderea colorantului în interior.

(„sîmburele" sau „miezul"), care pare să conţină nucleoproteine şi *c) doi corpi proteici* adaptaţi de o parte şi de alta în scobiturile „sîmburelui".

„Sîmburele" virionului este, la rîndul lui, înconjurat de un perete format din două straturi: unul *extern*, compus din numeroase subunităţi cilindrice de forma unui dop (⌀ 50 Å şi lungimea 100 Å), şi altul *intern*, *gros* de 50 Å, neted, lipsit de structură microscopică.

După Easterbrook, terminologia folosită pentru descrierea structurii virionului nu este adecvată complexităţii structurale a virusului vaccinal. Datorită structurii lui (material filamentos dens) „sîmburele" virusului vaccinei poate fi privit ca un echivalent al nucleocapsidei, dar corpii laterali adiacenţi şi învelişul său extern sînt foarte diferiţi de peplosurile celorlalte virusuri (herpes, mixovirus). Aceste învelişuri sînt evidenţiate ocazional la virionii pox, dar ele sînt exterioare faţă de învelişul propriu-zis al „sîmburelui" şi nu pot fi considerate drept componente integrale ale virionului.

„Sîmburele" sau „miezul" viral, izolat din virion, nu poate fi deosebit de forma imatură a virusului observată în celulele infectate. El ar corespunde, prin urmare, virionului imatur, care va deveni virus matur prin condensarea substanţei sale urmată de adiţia corpilor laterali şi a unui înveliş extern.

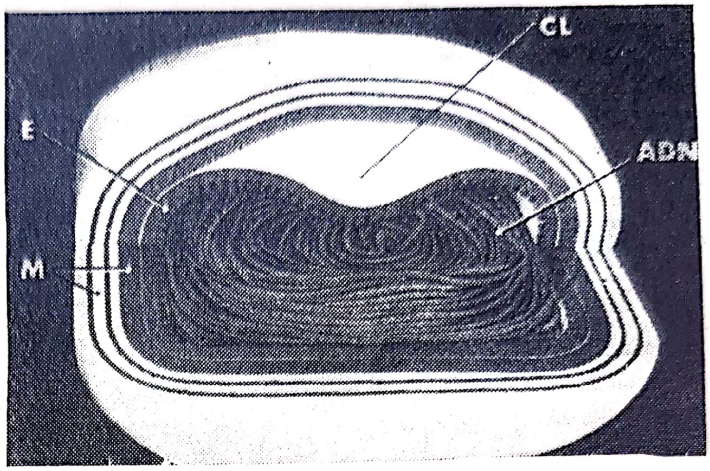


Fig. 32. Modelul de structură al unui virus din grupul *Pox* în care s-a practicat o semisecţiune verticală şi o semisecţiune orizontală. Se observă nucleoidul central biconcav care conţine ADN viral ca un filament împăturit, învelişul dublu al nucleoidului cu structură periodică (*E*), corpii laterali (*CL*) şi membranele periferice (*M*) (după Scherer).

Examenul suprafeţei virusului vaccinal, cu ajutorul coloraţiei negative, a pus în evidenţă o reţea de structuri tubulare cu ⌀ 70—90 Å, aparent goale, care acoperă particula. În legătură cu natura acestei reţele tubulare s-au emis două ipoteze: ar fi vorba fie de structuri proteice aparţinînd stratului periferic, echivalente cu capsomerele, fie de structuri dezoxiribo-nucleoproteice aparţinînd zonei biconcave centrale.

Genomul viral este alcătuit din ADN dublu helical cu gr. mol 150.10^6/particulă, localizat în zona discului central biconcav. Moleculele extrase din particule prin metode blînde au numai jumătate din gr. mol. amintită, ceea ce sugerează că fiecare particulă virală ar conţine două molecule mai mici de ADN sau una lungă, care s-ar rupe în cursul extracţiei.

ADN este conţinut în „sîmbure" şi eventual ar fi concentrat pe faţa internă a acestuia, care pe electronografii apare mai densă după colorare cu metode speciale. Pe secţiuni longitudinale se vede că ADN este aranjat oarecum la întîmplare, neorientat în raport cu axele „sîmburelui".

În afară de ADN (5,6%) şi proteine (89%), virusul vaccinal mai conţine lipide (5%), glucide (0,2%), o coenzimă — flavin-adenin-dinucleotid (FAD) — strîns legată de virion de care nu poate fi separată decît prin denaturarea proteinei virale, biotină şi ioni de Cu (0,05%), ca şi unele enzime — fosfatază, lipază, catalază — care par să fie impurităţi provenite din celula-gazdă. Îndepărtarea lipidelor determină pierderea infecţiozităţii particulei, ceea ce sugerează că ele ar fi componente proprii virusului.

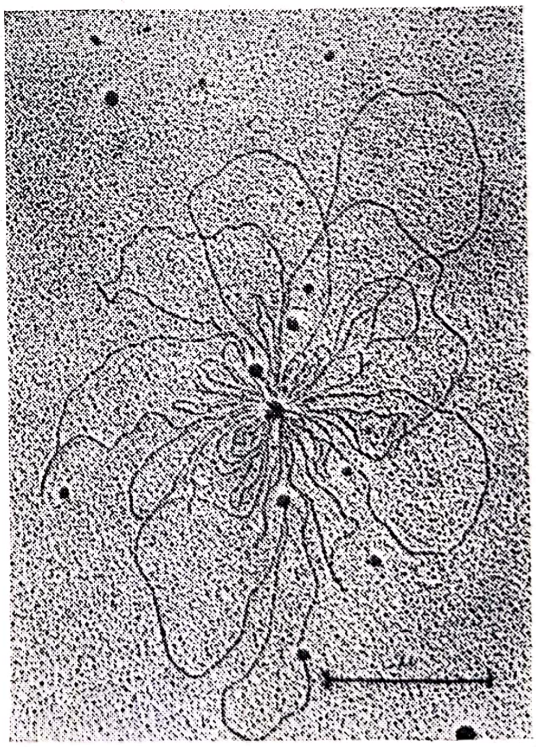


Fig. 33. Microelectronografia unei molecule ADN izolată din virusul vaccinal (scala = 1 μ).

Prezenţa Cu, a biotinei şi a flavinei (coenzimă a lanţului respirator) permit supoziţia că virusul vaccinei ar avea un sistem respirator rudimentar şi, ca atare, ar putea fi considerat ca o entitate la frontiera dintre virusuri şi organismele celulare. Imposibilitatea de a se demonstra totuşi existenţa unei activităţi enzimatice a particulelor virale a fost interpretată în sensul că enzimele evidenţiate ar fi resturi nefuncţionale ale unor predecesori celulari ai componentelor virale, ori contaminanţi din celula în care virusul s-a multiplicat, sau că, în sfîrşit, ele ar putea determina eventuale funcţii metabolice, dar numai în celula infectată.

6. COMPOZIŢIA CHIMICĂ A VIRUSURILOR

Acizi nucleici. *Genomul viral.* După cum am arătat, o caracteristică fundamentală a virusurilor este aceea că nu conţin niciodată ambii acizi nucleici, ci numai unul dintre ei: ADN (dezoxivirusuri) sau ARN (ribovirusuri).

ADN viral este în mod obişnuit dublu catenar — cu excepţia aceluia al fagului $\Phi \times 174$, care este monocatenar — iar ARN viral este de obicei monocatenar şi numai excepţional dublu catenar, aşa cum este acela al reovirusurilor. Mărimea genomurilor virale este corelată cu complexitatea virusurilor respective. Genomul cel mai simplu este acela al *virusului necrozei tutunului* (VNT), care este format din ARN, are circa 1 000 de nucleotide şi este deci capabil să determine formarea unei singure proteine de dimensiuni medii. Ca urmare, particulele mature ale acestui virus nu se găsesc niciodată singure în celulele plantei-gazdă, ci numai împreună cu un alt ribovirus, cu genom mai mare (circa 6 000 de nucleotide). Aceasta sugerează că VNT nu se poate replica decît cu ajutorul enzimelor virale specifice, codificate de genomul mai mare al virusului asociat care se comportă ca un virus „ajutător" (tab. 2).

TABELUL 2

GREUTĂŢILE MOLECULARE ALE UNOR VIRUSURI ŞI ALE GENOMURILOR LOR

	Virusul	Greutate moleculară virion	Greutate moleculară genom		Virusul	Greutate moleculară virion	Greutate moleculară genom
Virusuri ADN	Fag Φ 174	$6{,}2 \times 10^6$	$1{,}7 \times 10^6$	Virusuri ARN	Fag ARN	?	$1{,}3 \times 10^6$
	Poliom	40×10^6	$3{,}5 \times 10^6$		Virus nanism tomate	11×10^6	$1{,}7 \times 10^6$
	Adenovirus	177×10^6	23×10^6		Virus mozaic tutun	40×10^6	$2{,}1 \times 10^6$
	Herpes	?	60×10^6		Poliovirus	$6{,}8 \times 10^6$	$2{,}2 \times 10^6$
	Fag coli T_2	300×10^6	31×10^6		Gripă	280×10^6	2×10^6
	Vaccina	$2\,000 \times 10^6$	150×10^6		Virus Rous şi virus ajutător	$\sim 10^7$	?

Genomul ARN al fagului T_2 al E. coli conţine circa 3 000 nucleotide, deci este capabil să codifice legarea a 1 000 de aminoacizi (AA) în polipeptide, conform codului triplet. Dintre aceştia, circa 100 sînt folosiţi pentru construcţia de proteine structurale, aproximativ 300 sînt găsiţi în enzime care dirijează replicarea ARN viral (ARN sintetaza), iar restul de 600 formează 1—3 proteine-enzime necesare în procesele de reconstituire a virusului matur şi de liberare din celulă a celor 2 000—20 000 de particule virale noi.

Virusul poliomului — cel mai mic virus cu ADN — conţine un genom cu gr. mol. 3×10^6 (circa 5 000 de perechi nucleotide). El codifică sinteza a numai cîteva proteine, dintre care una cu rol structural (capsidală), iar celelalte cu funcţii enzimatice, necesare pentru dirijarea metabolismului nuclear al celulei infectate spre sinteza de virus. Replicarea acestui virus este mult uşurată de faptul că structura de bază a genomului său este identică aceleia a ADN din celula-gazdă. Ca urmare, replicarea ADN viral se face direct pe seama precursorilor nucleotidici din celula normală, folosind ADN-polimeraza gazdei, fără a fi necesară sinteza unor enzime specifice virusului.

Virusurile mai complexe au un material genetic proporţional mai complex. Spre exemplu, genomul fagului T_4 al *E. coli* are în structura sa circa 100 de gene, dintre care 15 sînt folosite pentru sinteza în celula-gazdă a unor precursori nucleotidici ai ADN fagic, circa 30 pentru biosinteza de proteine, altele pentru blocarea sintezelor normale ale celulei-gazdă etc.

În general, mărimea genomului viral este corelată cu mărimea şi complexitatea capsidei. Sinteza capsidelor mici, alcătuite din subunităţi de acelaşi tip, necesită o cantitate mică de material genetic, în timp ce pentru formarea unor capside mai complexe este nevoie de o informaţie mai bogată, localizată în gene morfopoietice.

Proteinele virale au rol structural, determinînd prin aranjarea lor simetrică formarea capsidei. Ele sînt toate de acelaşi tip sau de un număr limitat de tipuri diferite.

Glucidele virale, cu excepţia celor două pentoze din structura acizilor nucleici (riboza şi dezoxiriboza), care reprezintă constituenţi proprii virusului, sînt considerate ca provenite din celula-gazdă; galactoza, manoza, glucozamina şi alte glucide identificate la unele virusuri reprezintă deci simpli „contaminanţi".

Lipidele virale sînt de asemenea caracteristice celulei care a servit drept gazdă virusului şi ca atare sînt considerate tot „contaminanţi", deşi unele dintre ele joacă un rol important în pătrunderea virusurilor în celule şi prin aceasta condiţionează infecţiozitatea lor.

Virusurile cristalizate. Utilizînd metode de purificare şi cristalizare a proteinelor, W. Stanley (1935) a obţinut din plantele de tutun bolnave de mozaic o nucleoproteină cristalizată cu gr. mol. 4.10^7 şi formă de ace lungi ($15 \times 300\,\mu$), capabilă să reproducă şi să transmită boala în serie. Microscopia electronică a demonstrat ulterior că aşa-zisele „cristale Stanley" au în realitate structura paracristalină şi reprezintă aglomerări de virioni, grupaţi la un loc în mod ordonat. Primele cristale adevărate de virus au fost realizate în 1938 de

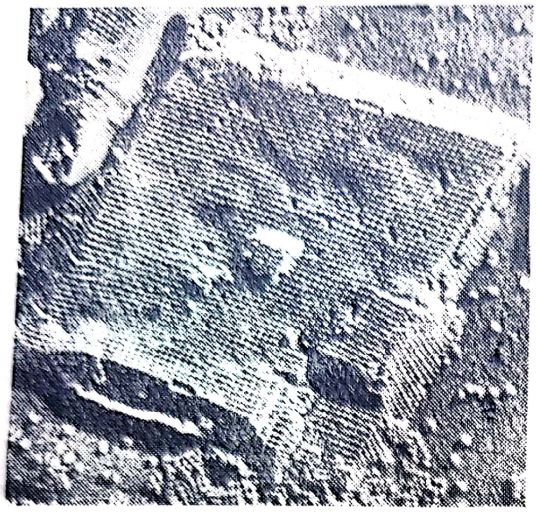


Fig. 34. Virusul necrozei tutunului. Se observă așezarea regulată a moleculelor în cristalele de proteină virală (după Labaw).

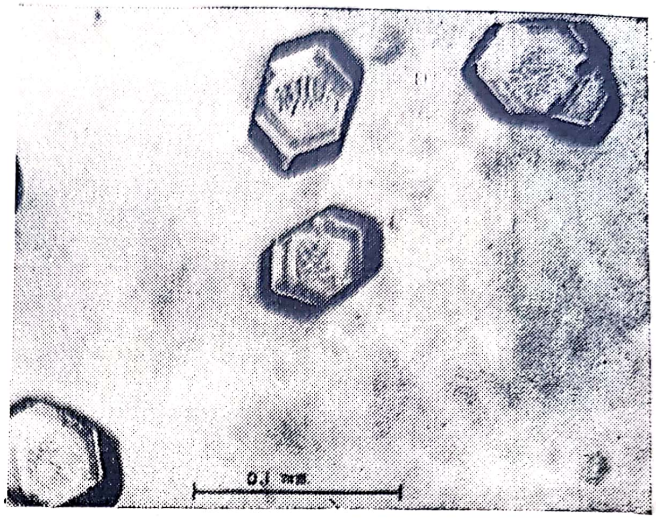


Fig. 35. Cristale de virus Coxsackie.

Bawden și Pirie, pornind de la virusul nanismului tomatelor (*bushy stunt*). Ulterior, au mai fost cristalizate o serie de virusuri patogene pentru animale și om (virusul poliedriei viermilor de mătase, poliovirus, adenovirus etc.).

7. CULTIVAREA VIRUSURILOR

Unul dintre caracterele fundamentale ale virusurilor este parazitismul lor absolut, adică incapacitatea lor de a se menține și multiplica în afara celulei vii, datorită lipsei echipamentului enzimatic, deci a unui metabolism propriu. De aceea virusurile nu pot fi cultivate pe nici un mediu artificial.

Cultivarea în organele animalelor infectate experimental. O primă metodă folosită pentru obținerea unor cantități mari de virus constă în infectarea unui animal de laborator receptiv, urmată de recoltarea organelor în care s-a multiplicat virusul, efectuată în perioada în care infecția este în plină evoluție sau imediat după moarte. În felul acesta, virusul gripal poate fi obținut din pulmonii de șoarece, șobolan sau dihor alb, virusul rabic din creierul de iepure sau de oaie, virusul polio din sistemul nervos al maimuțelor. Cantitatea de virus obținută în acest mod, apreciată prin titrul infectant al produselor respective, este destul de mare: 10^3—10^8 doze infectante pe mililitru.

Cultivarea în organele animalelor infectate experimental. O primă metodă de Rous (1911) și perfecționată tehnic după 1930 de Goodpasture și Burnet, cultivarea pe oul embrionat este utilă pentru o serie de virusuri animale, cu condiția ca produsele inoculate să nu fie infectate cu bacterii sau cu alte microorganisme. Se utilizează ouă de găină, cu embrioni în vîrstă de 6—15 zile (după natura virusului), la care inoculările se fac cu precauții de sterilitate

pe membrana corioalantoidă, în cavitatea alantoidiană, intravenos, intracerebral sau în sacul vitelin. După 4—7 zile de la incubare la 34—37°, în mod obişnuit embrionul moare din cauza leziunilor produse prin multiplicarea virusului, care poate fi recoltat din lichidul sau membranele în care este localizat.

Cultivarea în culturi de celule şi ţesuturi. Acest procedeu se bazează pe observaţia că diferitele celule sau ţesuturi care sînt scoase dintr-un organism prin biopsie sau imediat după moartea acestuia pot fi menţinute în stare de supravieţuire sau chiar pot prolifera *in vitro* dacă sînt hrănite în mod adecvat şi menţinute la o temperatură şi un *p*H favorabile.

Se folosesc obişnuit celule sau ţesuturi normale umane (embrioni în vîrstă de 2—4 luni, ţesut amigdalian sau uterin) sau animale (piele, rinichi, muşchi de iepure, maimuţă, cobai, şoarece etc.). De asemenea, se utilizează frecvent diferite ţesuturi tumorale. Cultivarea se făcea iniţial în mici fragmente de ţesuturi care conţineau fie celule vii dar neproliferante menţinute în stare de supravieţuire, fie celule în curs de proliferare.

Cultivarea virusurilor în strat monocelular. Rous (1916) a imaginat o tehnică — perfecţionată apoi de Dulbecco (1952) — prin care, cu ajutorul tripsinei, se obţine desfacerea legăturilor intercelulare prin „digestia" substanţei cimentante şi liberarea celulelor în suspensie. Celulele normale, care au o mare capacitate de adeziune pe suprafeţe solide, se ataşează de sticlă şi proliferează direct pe ea într-un strat monocelular continuu, în care efectul citopatic constînd din modificările patologice produse de virus poate fi evidenţiat direct prin transparenţa eprubetei sau a plăcii de cultură.

În prezent, pentru a preîntîmpina dificultăţile legate de recoltarea, transportul şi iniţierea unei culturi de celule pornind de la un ţesut scos prin biopsie sau imediat după moartea organismului donator, se folosesc curent *linii celulare* stabilizate, transplantabile în serie, recunoscute ca foarte adecvate pentru cultivarea unui anumit virus. Cultivarea virusurilor pe „linii celulare" are avantajul că sensibilitatea celulelor respective faţă de un anumit virus este stabilă şi cunoscută, iar rezultatele obţinute în diferite laboratoare sînt comparabile. Astăzi există numeroase „linii celulare" răspîndite în toate laboratoarele din lume, aşa cum sînt, de exemplu, celulele *HeLa* provenite dintr-un neoplasm al colului uterin.

După infectarea culturii de celule, virusul se multiplică în celule, apoi trece la exterior în urma lezării membranei celulare sau a distrugerii celulei, astfel încît el poate fi găsit în cantităţi mari în mediul nutritiv folosit pentru a păstra viabilitatea culturii de celule.

8. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR

Virusurile reprezintă o categorie aparte de agenţi infecţioşi, a căror multiplicare se face exclusiv în celule vii-gazdă, care furnizează nu numai materialul de construcţie dar şi întregul „dispozitiv" celular necesar pentru reproducerea particulelor virale.

Virusul invadant introduce în celula-gazdă informaţia specifică a propriului său genom, care deviază metabolismul celular în aşa fel încît, în loc să se mai

Scanned with OKEN Scanner

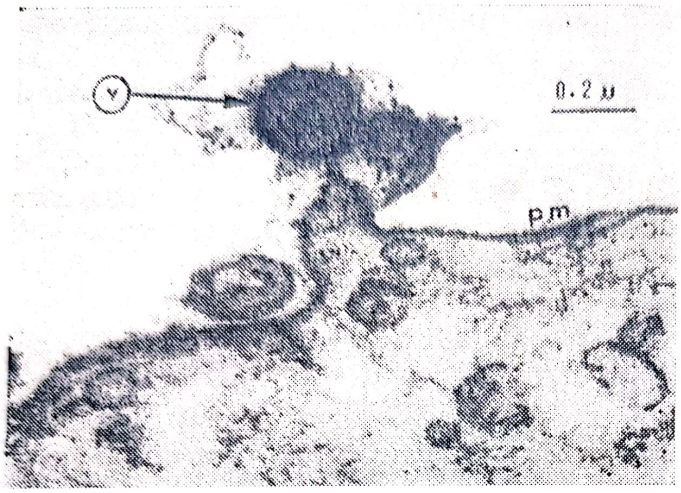


Fig. 36. Particulă virală (*v*) adsorbită pe membrana plasmatică (*pm*) a unei celule *HeLa* (după Silverstein).

formeze constituenţi celulari, se face sinteza unor enzime speciale necesare pentru fabricarea de produşi virali. Multiplicarea virusului reprezintă deci o consecinţă a introducerii în celulă a unui acid nucleic străin, cu proprietăţi biologice specifice. Procesul decurge într-o serie de etape succesive: *1*) adsorbţia şi fixarea virusului pe celula-gazdă; *2*) pătrunderea virionilor în celulă; *3*) replicarea genomului viral în celula-gazdă; *4*) sinteza proteinelor virale şi morfogeneza virionului; *5*) liberarea din celulă a particulelor virale progene.

Adsorbţia şi fixarea virusurilor pe celulă. Pentru a pătrunde eficient în celulă, virusul trebuie să dispună de un mecanism care să-i asigure fixarea pe celula-gazdă pînă în momentul cînd este înglobat în ea. Acest mecanism variază nu numai după morfologia virusului, dar şi în funcţie de celula-gazdă. Una dintre particularităţile virusurilor — specificitatea lor pentru anumite gazde — este în primul rînd o specificitate de fixare. Într-adevăr, dacă în locul unui virus se utilizează experimental pentru infectare numai acidul lui nucleic pur, debarasat de capsidă, pentru a se evita fixarea, gama celulelor receptive la acel virus creşte. Structura cea mai adecvată pentru fixare este aceea a *bacteriofagului*, care de aceea şi are un înalt grad de specificitate faţă de celula-gazdă.

V i r u s u r i l e p l a n t e l o r nu au specificitate de fixare deoarece nu pot adera la peretele celulozic al celulelor vegetale şi nu-l pot străbate decît dacă integritatea lui a fost afectată prin leziuni mecanice. De aceea infectarea plantelor necesită cantităţi mari de virus; în schimb, o dată produsă ea este însoţită de o multiplicare virală foarte abundentă în celulele infectate.

V i r u s u r i l e a n i m a l e se fixează mult mai puţin specific şi mai puţin eficient decît fagii. După o serie de ciocniri întîmplătoare ale virusului cu celula respectivă, rezultate din mişcarea browniană, şi după o fază de adsorbţie nespecifică reversibilă, urmează faza de adsorbţie specifică ireversibilă. Stabilitatea adsorbţiei specifice depinde de forţe electrostatice (influenţate de *p*H şi concentraţia cationilor) sau, în unele cazuri, de complementarităţi între molecule specifice de pe suprafaţa virusului şi de pe aceea a celulei cu care el a venit în contact. În condiţii favorabile de complementaritate geometrică şi electrostatică, virusul şi celula se leagă prin legături ionice van der Waals sau prin legături de *H* suficient de puternice pentru a contracara forţele de dispersie. După A l l i s o n şi V a l e n t i n e, grupările *amino* ale capsidei virale ar interacţiona cu grupările *fosfat* puternic acide ale suprafeţei celulei-gazdă. Rata

fixării (eficiența coliziunilor) observată frecvent este de $3—5 \times 10^9$ datorită faptului că o particulă virală trebuie probabil să se lovească de mai multe ori de o celulă înainte de a se fixa specific pe ea.

În sfîrșit, unele virusuri (v. gripal) se fixează pe *receptori* celulari specifici de natură glicoproteică, al căror grup prostetic reprezintă substratul de acțiune al unei enzime virale (neuraminidaza) „distrugătoare de receptor", care favorizează infecția. Întrucît atît virusul cît și suprafața celulei sînt electronegative, este necesară prezența cationilor care să scadă repulsia lor electrostatică.

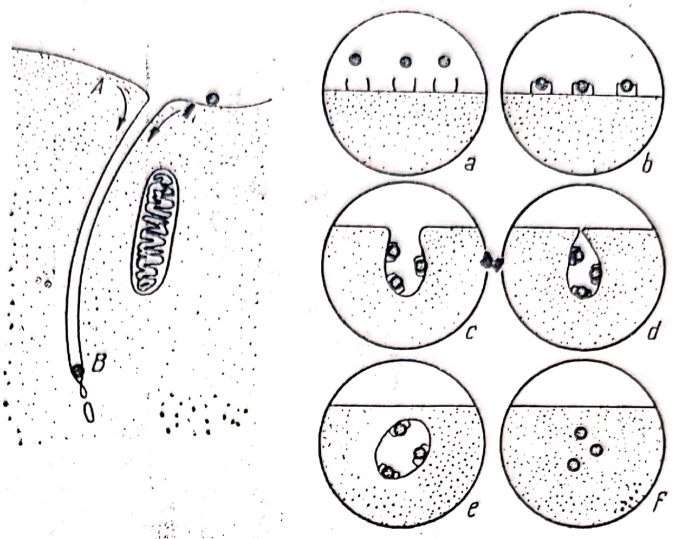


Fig. 37. Fazele procesului de pinocitoză (după Bennet): *stînga* — picătura *A* ajunsă în contact cu membrana celulară induce o invaginare progresivă a acesteia, formarea unui canal (*B*) la capătul căruia picătura de lichid ingerată va fi inclusă într-o veziculă; *dreapta* — fazele succesive ale procesului: *a* — apropierea picăturilor de lichid; *b* — fixarea lor; *c* — invaginarea membranei celulare; *d* și *e* — formarea veziculelor; *f* — transferul picăturilor în citoplasmă.

Pătrunderea virionilor în celulă. După fixare, virusurile animale pătrund intacte în interiorul celulei-gazdă printr-un proces activ de ingestie, denumit *viropexie* (F a z e k a s, S t. G r o t h), care este analog celui de *pinocitoză* (proces prin care celulele captează și înglobează picături de lichid prin invaginarea membranei celulare. După ce contactul intim s-a realizat, membrana celulară „alunecă" pe suprafața virionului și formează o mică invaginare care se adîncește progresiv, iar apoi se strangulează ca un mugure. Virusul închis în „vacuola" astfel rezultată este introdus pe această cale în celulă, în timp ce marginile opuse — rămase libere — ale membranei celulare invaginate fuzionează pentru a restabili integritatea suprafeței celulare. Virusul rămîne inclus într-o veziculă citoplasmică ai cărei pereți se dezintegrează liberînd virionul în celulă.

Biochimia și cinetica replicării virusurilor. Acidul nucleic viral acționează în celulă ca un material genetic străin, care conține toată informația necesară pentru a dirija sinteza mai multor tipuri de componenți macromoleculari, asigurînd în felul acesta propria sa replicare, formarea proteinelor structurale de capsidă, a inhibitorilor biosintezelor celulare normale, a unor proteine care reglează activitățile metabolice ale celulei infectate etc. În această fază virusul se găsește în celulă sub formă de *virus vegetativ*.

Dezvoltarea virusului în celulă comportă trei faze: *a*) replicarea informației genetice virale, *b*) traducerea acestei informații în sinteza de proteine virale și *c*) morfogeneza virusului.

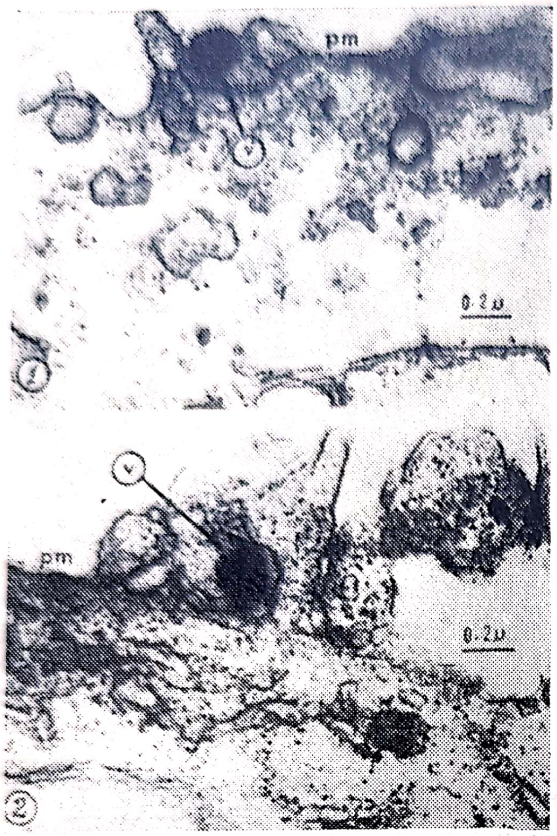


Fig. 38. Pătrunderea virusului în celula-gazdă:

1 — particula virală (*v*) este parţial acoperită de o invaginare a membranei plasmatice (*pm*) a unei celule *HeLa; 2* — virionul este înconjurat de pseudopodelele celulei şi inclus în vacuola de endocitoză (după Silverstein).

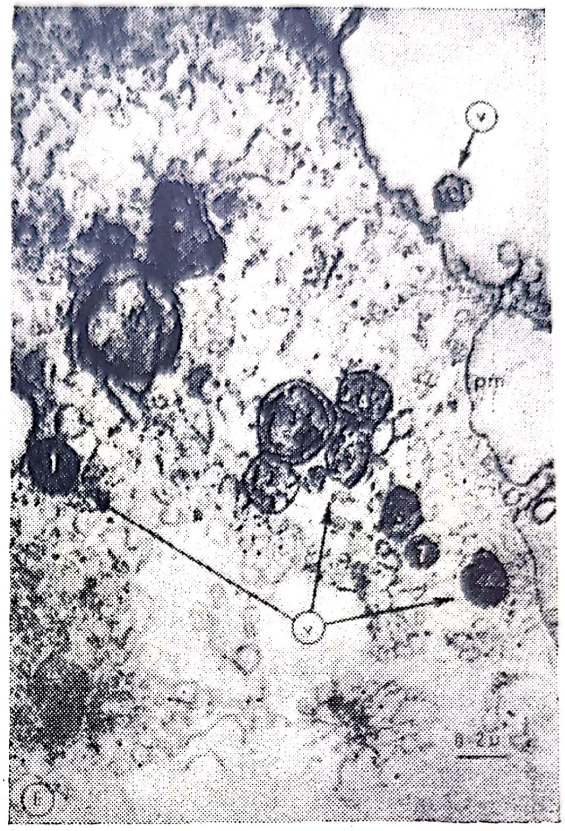


Fig. 39. Particule virale (1—8) înconjurate de cîte o membrană vacuolară răspîndite în citoplasma unei celule *HeLa* — aflate în diferite faze de degradare intracelulară; *v* — virion intact extracelular; *pm* — membrana plasmatică a celulei; *M* — mitocondrie (după Silverstein).

Replicarea genomului viral în celula-gazdă. Pentru a-şi exercita funcţia, genomul viral trebuie să fie mai întîi debarasat de învelişurile sale. La unele virusuri, acest proces are loc simultan cu dezintegrarea membranei vacuolare, care izolează virusul de citoplasmă. La altele, capsida este degradată chiar în vacuolă, sub acţiunea enzimelor proteolitice ale celulei, iar acidul nucleic viral părăseşte vacuola fără a-i rupe peretele, fiind găsit la aproximativ o oră de la infecţie în matricea citoplasmică din vecinătatea nucleului. Soarta capsomerelor nu este cunoscută, dar se crede că, devenite nefuncţionale, ele intră în metabolismul general al celulei.

Perioada în care acidul nucleic este liber, „nud", a fost descrisă ca o fază de dispariţie a virusului infecţios *(faza de eclipsă)*. În realitate, este însă vorba numai de o schimbare de stare a virusului care-l face mai greu de evidenţiat. În această fază virusul are o infecţiozitate mică, deoarece acidul nucleic izolat are mai puţine posibilităţi de a iniţia infecţia, în comparaţie cu virusul complet matur.

Urmează o perioadă de aproximativ o oră în cursul căreia AN „nud" ajunge la locul unde se vor replica enzimele implicate în sinteza AN şi a proteinelor virale, precum şi la locul în care se acumulează energia necesară proceselor de replicare şi sinteză.

În acest proces, la care virusul contribuie numai cu informaţia sa genetică, celula-gazdă furnizează tot materialul necesar sintezelor codificate de genomul viral (aminoacizi, nucleotide), enzimele, ARN_t şi propriile sale sedii de sinteză (ribosomii), precum şi energia necesară acestor sinteze; dependenţa virusului faţă de activitatea vitală a celulei sale gazdă este, prin urmare, totală, de unde parazitismul său absolut.

Biosinteza proteinelor induse de virus. Sub influenţa genomului viral în celula-gazdă se formează două categorii de proteine: „precoce" şi „tardive".

Proteinele „precoce", esenţiale pentru iniţierea replicării genomului viral, sînt sintetizate în cea mai mare parte sub controlul genomului viral parental introdus prin infecţie. În plus, funcţiile acestor proteine care acţionează ca enzime sînt: *a*) inhibarea replicării ADN, ARN şi a proteinelor specifice celulei-gazdă şi *b*) cataliza sintezei unor proteine care constituie „matricea virală", adică spaţiul în care au loc replicarea, asamblarea şi morfogeneza virusului.

Aceste enzime noi pot cataliza reacţii foarte diferite de cele care au loc în celula-gazdă, sau pot fi de tipul celor deja existente în celula neinfectată, dar diferite de acestea prin anumite proprietăţi fizico-chimice.

Proteinele „tardive" apar în special sub influenţa genomurilor virale progene, produs al replicării virale în celula-gazdă. Ele sînt proteine de structură (capsidale) şi proteine de reglare care întrerup formarea enzimelor induse de virus şi care asigură desfăşurarea reacţiilor legate de maturarea şi liberarea virusului din celulă.

Replicarea genomului viral se face sub acţiunea polimerazelor specifice virusului respectiv, fapt pus în evidenţă de studiul cineticii acestui proces. Virusurile care conţin un ARN monocatenar au o perioadă de latenţă mai scurtă decît cele cu ARN sau ADN dublu catenare. De asemenea, timpul de dublare a numărului virionilor este mai scurt la virusurile cu ARN monocatenar. Aceasta se datoreşte în primul rînd faptului că genomul constînd din ADN trebuie să servească succesiv ca matriţă pentru propria sa replicare şi pentru formarea de ARN_m specific viral, necesar pentru codificarea sintezei proteinelor, în timp ce genomul alcătuit din ARN poate exercita concomitent cele două funcţii de matriţă legate una de propria lui replicare şi cealaltă de sinteza proteinelor virale. În plus, replicarea unui genom mai complex, cum este acela constituit din ADN dublu catenar, necesită o perioadă mai lungă de timp.

Morfogeneza virionului. La sfîrşitul fazei de biosinteză, în care în celula-gazdă se acumulează cantităţi mari de acid nucleic şi proteine virale, urmează *faza de asamblare*, de grupare a acestor componente pentru a forma structura organizată a particulei virale mature.

La virusurile mici, direcţiile de aranjare a materialului capsidei sînt determinate de însăşi conformaţia constituenţilor lui, care se leagă între ei spontan şi formează o structură organizată printr-un proces de *autoasamblare*. Pentru

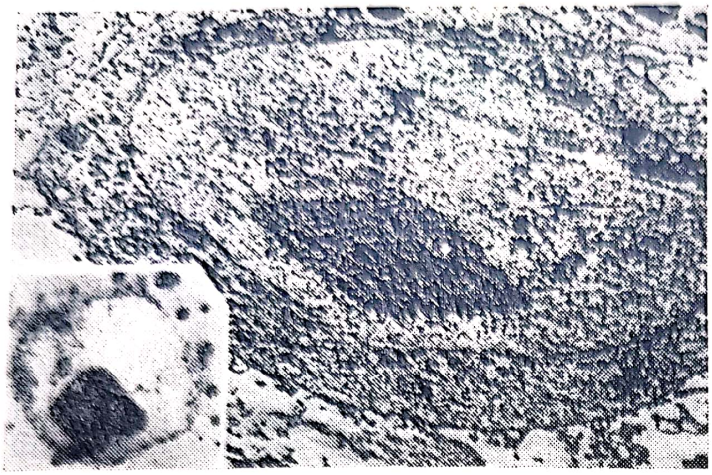


Fig. 40. Agregat de particule de adenovirus în forma unui cristal regulat cu profil romboidal, localizat în nucleul unei celule infectate (după Block).

cele mai multe virusuri, maturarea nu implică participarea unor enzime, deoarece între AN şi capsidă se formează de obicei numai legături secundare slabe.

La virusurile mai complexe, procesul de asamblare este mai complicat şi implică participarea unor gene morfogenetice printr-un proces care nu este cunoscut în detaliu. Virusurile cu înveliş extern capătă această structură, care se formează dintr-o porţiune a membranei celulare sau nucleare, în faza terminală a maturării.

Sediul sintezei şi maturării virusurilor. Replicarea şi morfogeneza virusurilor sînt procese intracelulare care au loc fie în nucleu, fie în matricea citoplasmatică. Ribovirusurile se multiplică în citoplasmă, cu cîteva excepţii, cum ar fi, de exemplu, virusul gripal, la care nucleocapsida se formează în nucleu, iar hemaglutininele în citoplasmă. Virusurile cu ADN se replică în nucleul celulei, cu excepţia poxvirusului care se formează în citoplasmă. La virusurile cu peplos, indiferent de natura acidului nucleic, formarea virusului se desăvîrşeşte către periferia celulei, unde nucleoproteina virală este îmbrăcată de un înveliş lipoproteic derivat din membrana celulară.

Durata ciclului de dezvoltare este mai mare la virusuri decît la bacterii şi variază între 12 şi 90 de minute pentru fagi, 4 ore pentru virusul gripal şi 6 ore pentru virusul herpetic.

Liberarea din celulă a particulelor virale progene. Acest proces evoluează deseori cu particularităţi proprii diferitelor virusuri.

În timp ce virusurile cu ADN (cu excepţia virusului herpesului) tind să fie reţinute în celule chiar după apariţia efectului citopatic şi sînt de aceea eliberate cu frecvenţă mică sau moderată, virusurile cu ARN sînt liberate masiv.

Liberarea virusurilor se poate face rapid şi exploziv prin ruperi mecanice (în modul cel mai brutal la bacteriile infectate cu fagi, care practic „explodează") sau lent şi controlat prin străbaterea membranei celulare a cărei permeabilitate este mărită în urma alterărilor morfologice produse de virus. În unele cazuri, virusul trece direct de la o celulă la alta adiacentă; alteori, infecţia unor celule noi este condiţionată de trecerea prealabilă a virusurilor în afara celulei-gazdă în care au fost produse. Mecanismul liberării este

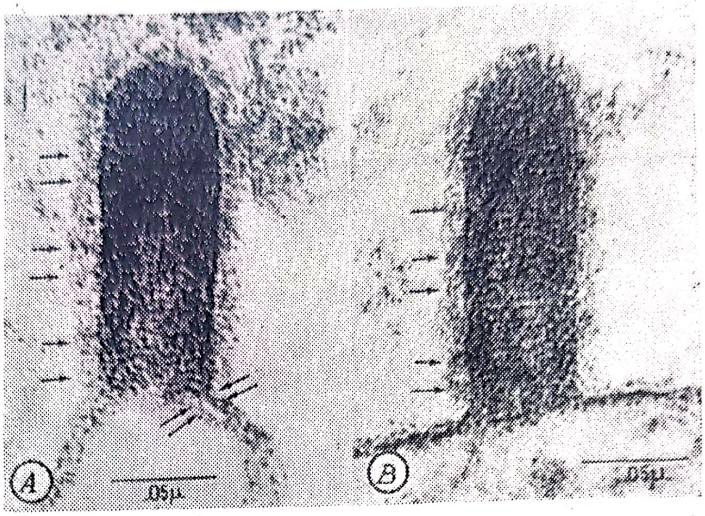


Fig. 41. *A*, *B* — eliberarea unui virion din celulă. Săgeţile duble indică regiunea în care învelişurile celulare şi virale apar în continuitate. Săgeţile simple indică prelungiri ale învelişului extern al virionului (după Dales).

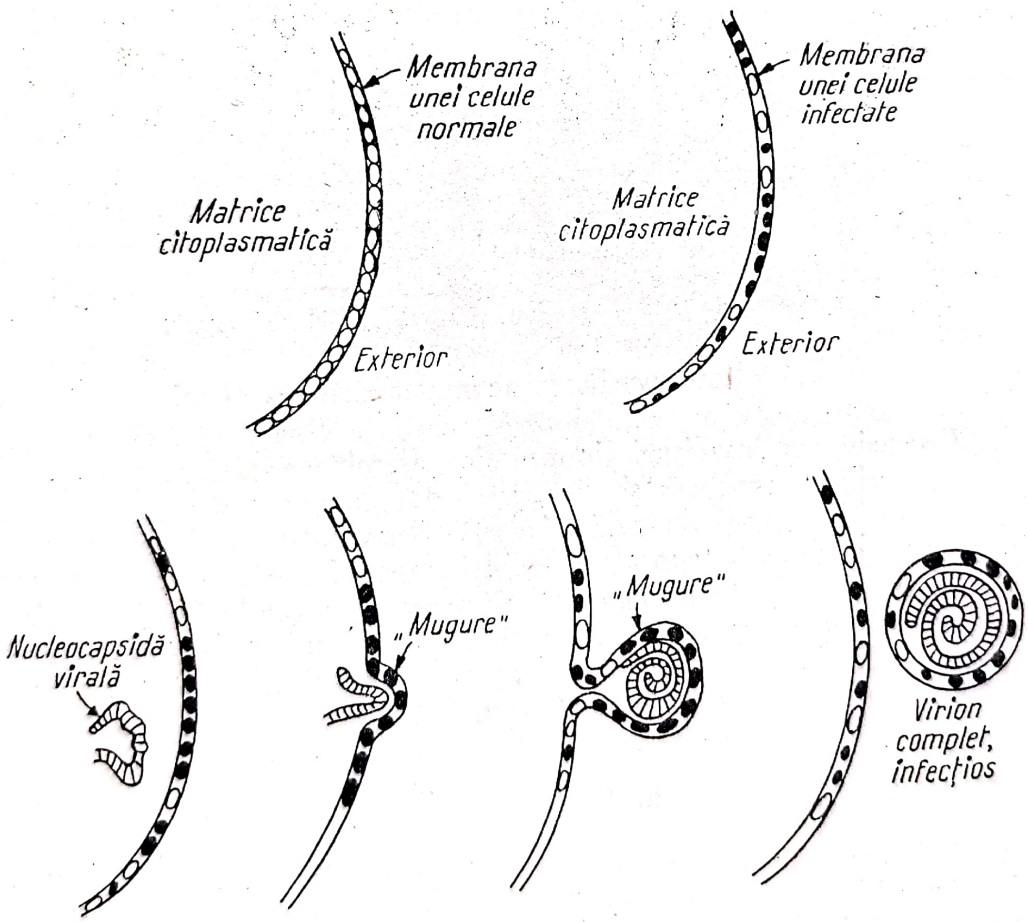


Fig. 42. Reprezentarea schematică a mecanismului de eliberare a virusului din celulă prin înmugurire. Formaţiunile ovalare albe din structura membranei celulare normale reprezintă schematic materialele de construcţie normale, sintetizate sub controlul genelor celulare. Formaţiunile ovalare negre din membrana celulelor infectate corespund hemaglutininelor virale care sînt sintetizate sub controlul genelor virale şi încorporate în aceste membrane înainte de a începe eliberarea virionilor (după Davis).

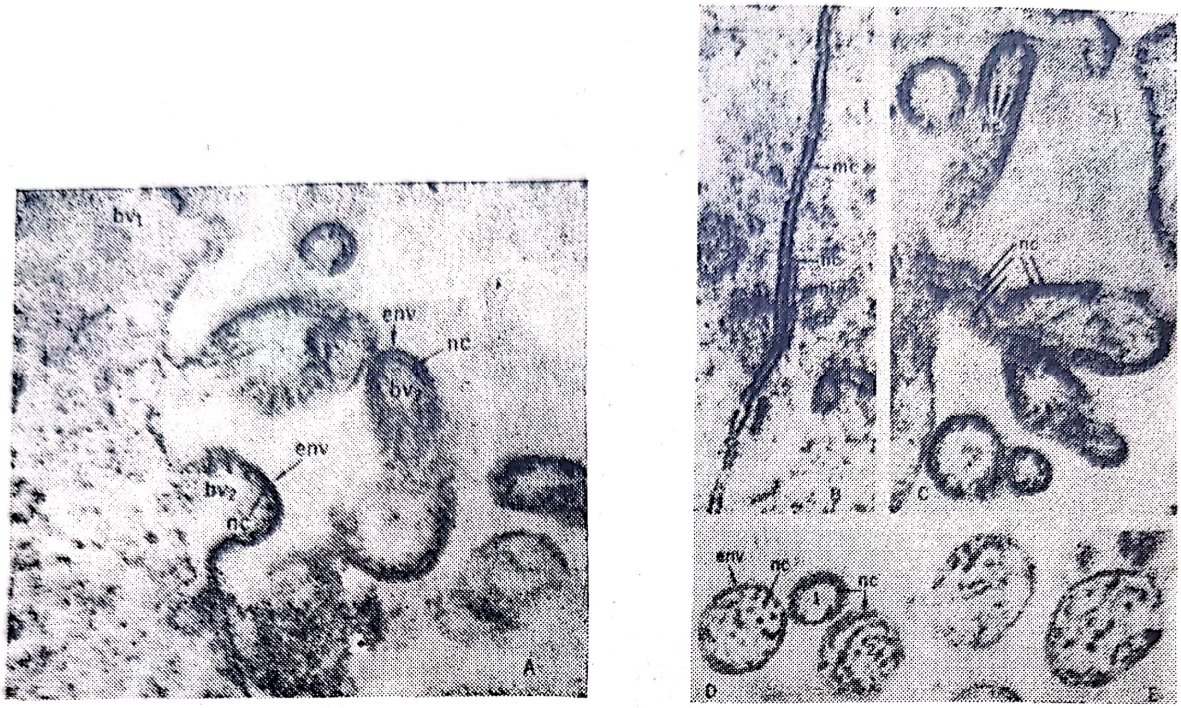


Fig. 43. Formarea învelişurilor virusului paragripal la nivelul membranei celulelor şi eliberarea lui: *A* — muguri" virali (*bv*) în diferite faze de dezvoltare: membrana celulară alterată formează peplosul viral (*env*); *nc* — nucleocapside secţionate transversal (bv_1 şi bv_2) şi longitudinal (bv_3); *B* — diferenţierea peplosului viral: se diferenţiază în membrana internă (*mi*) şi stratul extern (*cp*) al peplosului; *C* — împingerea membranelor celulare care formează peplosul; *D* şi *E* — secţiuni prin virioni (după Davis).

de asemenea diferit. Poliovirusurile se acumulează în cantităţi mari — mii de particule — în citoplasma celulei-gazdă care le liberează prin moartea ei bruscă. Virusurile cu învelişuri lipoproteice asamblate către suprafaţa celulei sînt liberate printr-un proces similar celui de „înmugurire". Herpesvirusul şi vaccina sînt închise într-o veziculă (cisternă) derivată din reticulul endoplasmic şi transportate astfel spre suprafaţa celulei unde vin în contact cu membrana celulei. Printr-o deschizătură apărută în membrana celulară, virusul iese din celulă învelit în membrana internă a cisternei. Ca urmare, după aproximativ 6 ore de la infecţie începe o liberare continuă de virus care durează pînă la degenerarea celulei infectate (circa 10 ore).

a. Biosinteza VMT

După infectarea celulei-gazdă, ARN viral se liberează din învelişul său proteic, probabil în nucleul acesteia, sub forma unei molecule unice monocatenare. După replicarea şi acumularea lui în cantităţi mari, el trece din nucleu în citoplasmă, unde are loc sinteza proteinelor virale sub forma unor molecule aproximativ elipsoidale, care tind să se alipească şi să se agrege atunci cînd se lovesc unele de altele. În prezenţa ARN viral se realizează un proces de asamblare care decurge ca o cocristalizare sau coagregare a două

specii moleculare compatibile, pentru a da naştere unor particule care devin progresiv mai stabile pe măsură ce cresc, deoarece fiecare proteină se leagă de alte 6 molecule proteice vecine şi de lanţul de ARN din interiorul structurii în curs de constituire. Aceasta explică stabilitatea sporită a particulei astfel formate, în raport cu proteinele şi ARN izolate.

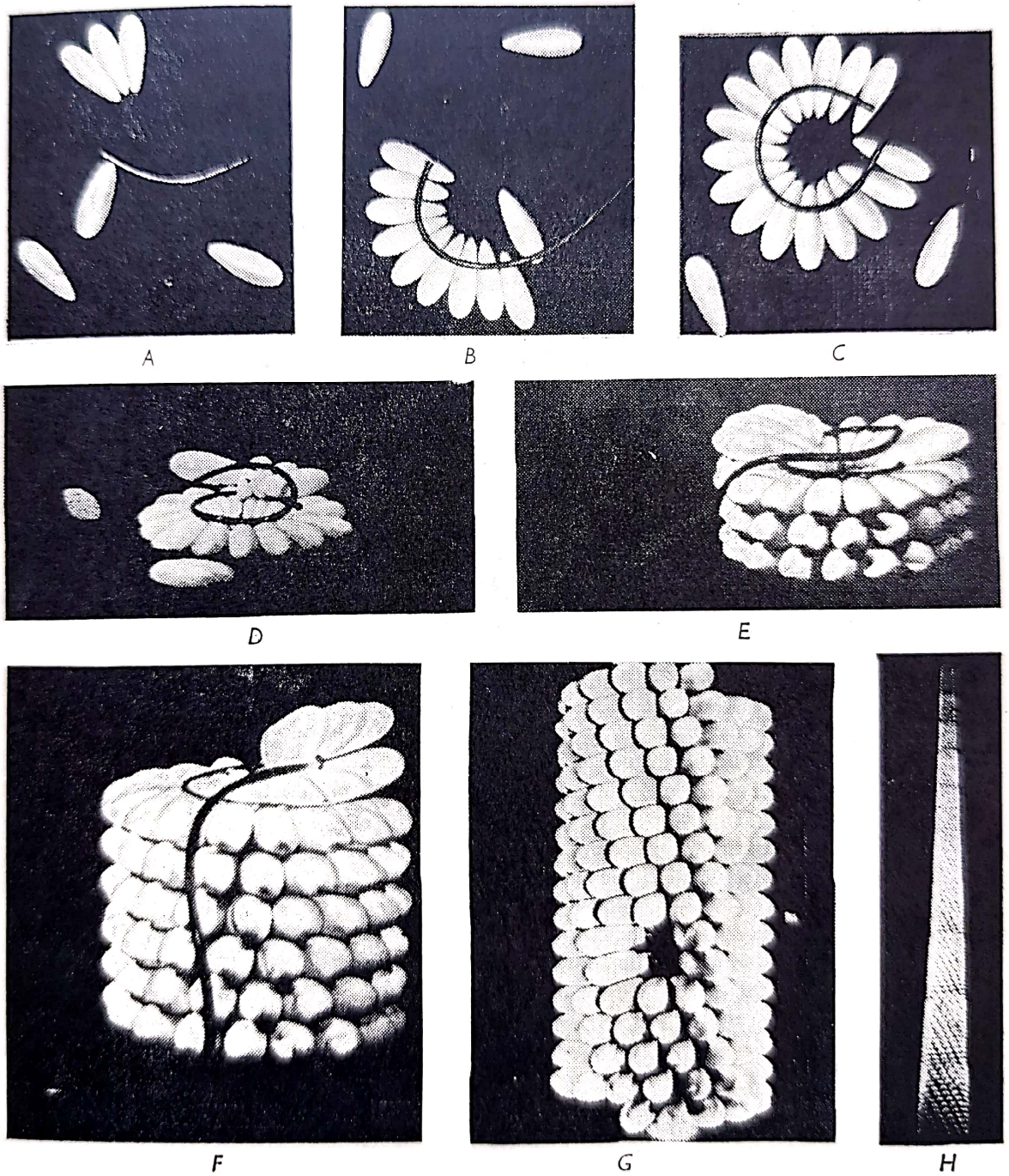


Fig. 44. Etapele succesive (*A—H*) ale procesului de autoasamblare a virusului mozaicului tutunului, prin agregarea subunităţilor proteice reprezentate prin forme ovalare albe şi a ARN viral (reprezentat ca un filament) (după Fraenkel-Conrat).

Scanned with OKEN Scanner

Asamblarea subunităţilor proteice se face automat şi *in vitro*, de unde reiese că forma virionului este dictată integral de forma şi afinităţile de grupare ale proteinelor sale, morfogeneza fiind rezultatul unui proces de adiţie a unor subunităţi identice aşezate în poziţii identice. Dovadă este faptul că există „virus exclusiv proteic" (fără ARN), care însă este nefuncţional, adică neinfecţios. Prezenţa ARN asigură infecţiozitatea, capacitatea de reproducere şi, în plus, determină mărimea particulei virale.

b. Replicarea ribovirusurilor animale

Replicarea virusurilor cu ARN constituie o problemă unică în biologie, deoarece oferă singurul exemplu în care informaţia genetică este codificată originar nu în ADN — depozitarul universal de informaţie genetică — ci tot într-o moleculă de ARN înzestrată, ca şi cea de ADN, cu capacitate de replicare. În cursul infecţiei unei celule-gazdă, ARN viral îndeplineşte o dublă funcţie: *a*) acţionează direct în procesul de biosinteză a proteinelor ca

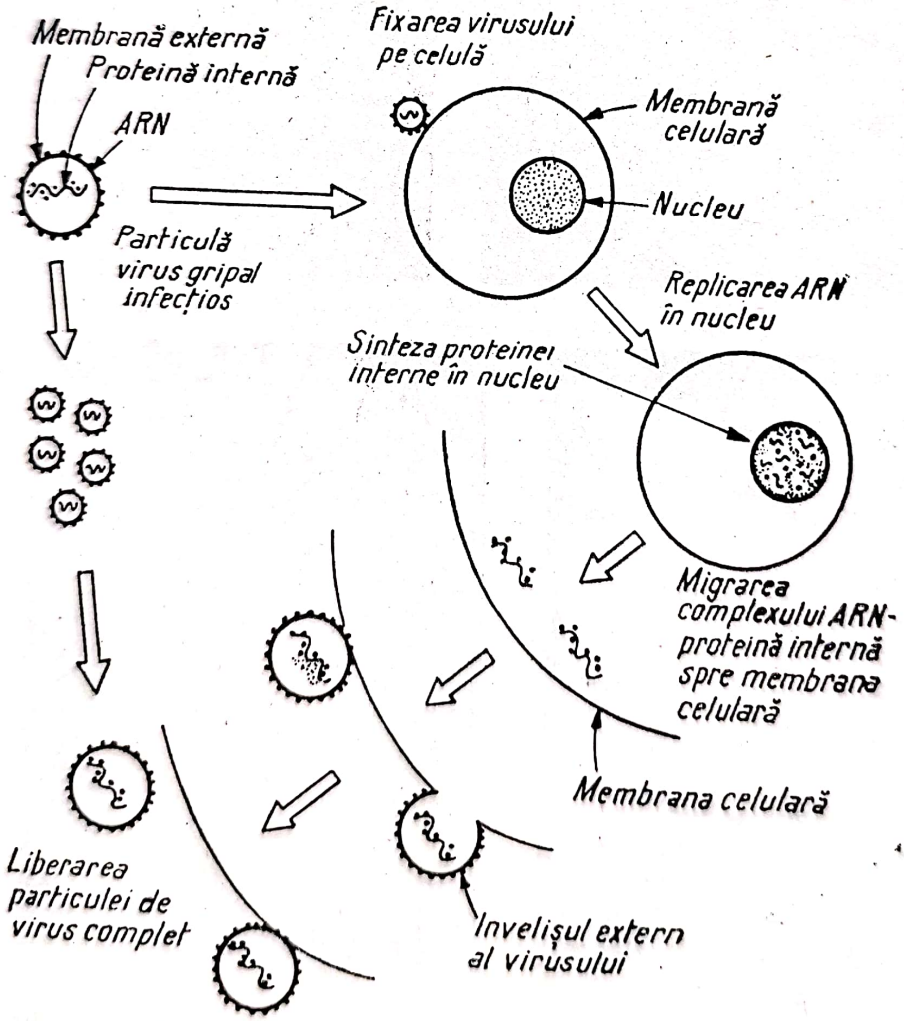


Fig. 45. Principalele faze ale multiplicării unui myxovirus (virusul gripal) (după Watson).

transportor al mesajului genetic furnizînd informaţia necesară pentru sinteza proteinelor structurale ale capsidei şi a enzimei ARN — polimeraza; *b*) acţionează ca model pentru sinteza a noi molecule de ARN sub acţiunea acestei polimeraze. Studiile în această problemă s-au făcut pe virusul polio, virusul encefalomiocarditei ş.a. După infectarea celulei-gazdă şi dezvelirea genomului din virion, ARN viral rămîne liber în citoplasmă. Titrul infecţios al virusului (apreciat prin capacitatea celulelor infectate de a determina infectarea altor celule) scade foarte mult datorită acestei stări particulare în care se găseşte virusul (*faza de eclipsă*). În procesul de replicare, ARN viral acţionează atît ca model pentru propria sa reproducere, cît şi ca ARN_m pentru sinteza proteinelor specifice virale. Într-o primă fază, acest ARN „dezgolit" dirijează sinteza unor proteine cu acţiune inhibitoare faţă de metabolismul celular, precum şi sinteza unei ARN-polimeraze corespunzătoare lui. Urmează sinteza ARN viral, care începe după 30—45 de minute de la infecţie şi continuă exponenţial 3 ore, apoi, liniar, încă 2—3 ore. Sub influenţa genomului poliovirusului (circa 6 000 de nucleotide) în celula-gazdă apar aproximativ 14 tipuri noi de proteine. Dintre acestea, 4 au rol structural, participînd la formarea capsidei, iar celelalte — proteinele virus-specifice necapsidale — îndeplinesc diferite funcţii ca: *a*) alterarea metabolismului normal al celulei-gazdă prin blocarea sintezei propriului ei ARN; *b*) blocarea sintezei proteinelor celulare normale; *c*) cataliza formării unor cantităţi mari de ARN viral. Proteina capsidală este sintetizată cu puţin înainte de formarea virusului matur. În acest timp se acumulează în celulă o cantitate mare de proteine virale, constînd din agregate polimerice de subunităţi proteice (capsomere), care vor fi utilizate pentru formarea de virus matur sau se vor acumula simplu, ca atare, în celulă. Sinteza acestor proteine are loc în citoplasmă, la nivelul unor agregate de ribosomi (polisomi), care în celula infectată sînt mult mai mari decît în celula normală şi sînt asociaţi de obicei cu structuri membranoase lipidice, avînd rolul de a separa sediul procesului infecţios de restul citoplasmei.

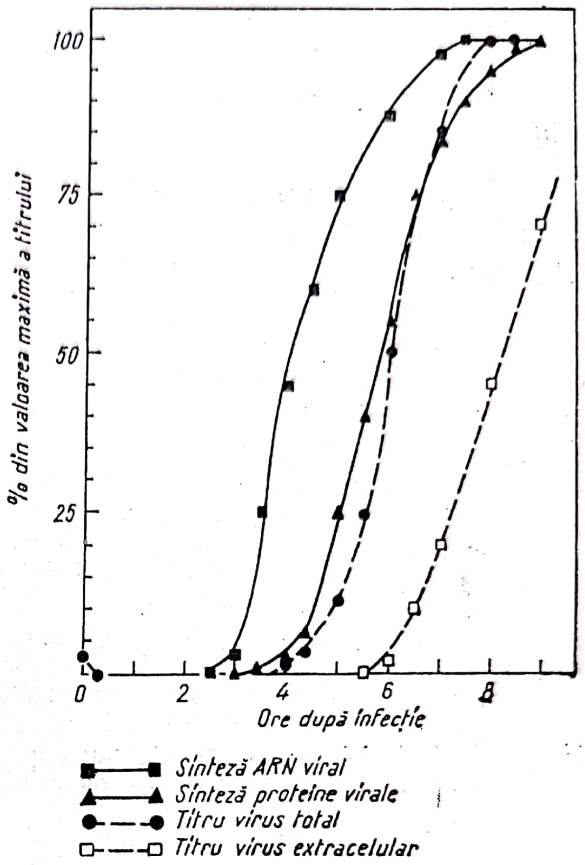


Fig. 46. Dinamica biosintezei constituenţilor virali şi a formării de virus matur după infectarea unor culturi de celule (după Martin).

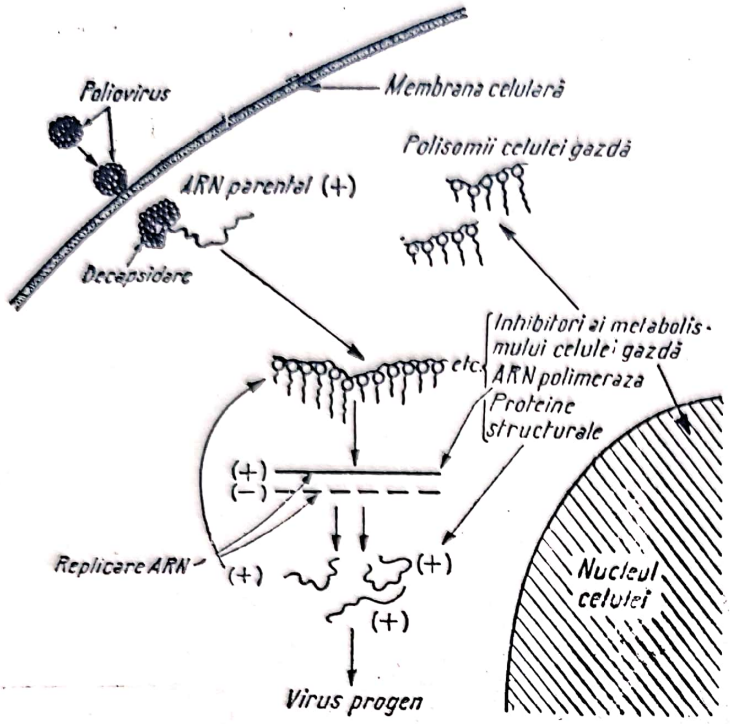


Fig. 47. Principalele etape ale multiplicării poliovirusului în citoplasma celulelor infectate (după Summers).

Maturarea sau morfogeneza virusului ar fi un proces spontan, care nu necesită energie, evoluînd sub acțiunea forțelor reprezentate de afinitatea chimică existentă între proteinele capsidale și, în mai mică măsură, între acestea și ARN viral. El începe după 2—3 ore de la infecție și continuă apoi în ritm foarte rapid: sinteza unei molecule de ARN durează aproximativ 1 minut, iar după alte 2—3 minute el este încorporat în capsidă. De altfel, numai 20—60% din ARN viral nou sintetizat este încorporat în particule de virus matur, în timp ce restul rămîne în celulă, fie pentru a fi folosit ca model (template) sau ca mesager,

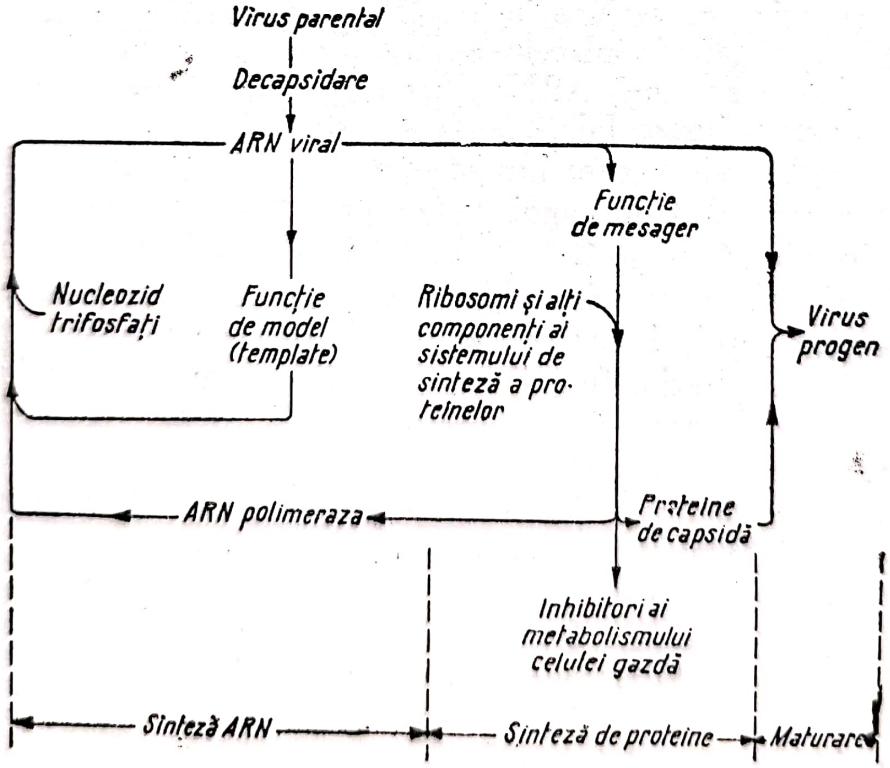


Fig. 48. Fazele procesului de replicare a virusurilor mici care conțin ARN (după Martin).

fie pentru că pur și simplu nu poate fi încorporat. După 6 ore de la infecție, începe liberarea progresivă a virusului progen din celula-gazdă. ca rezultat al modificărilor ei patologice induse de virus

c. Replicarea virusurilor cu ADN

— *Cinetica replicării intracitoplasmice a virusului vaccinal.* După pătrunderea virusului în celulă prin viropexie, învelișul său extern fosfolipido-proteic este rapid degradat, probabil sub acțiunea unor factori preexistenți în celula infectată.

Replicarea ADN, care începe după 30 de minute pînă la 2 ore de la infecție, atinge un nivel maxim la aproximativ 90 de minute și se termină după 5 ore, are loc în zone sau incluzii citoplasmatice mari, adevărate „fabrici" de virus. După încheierea procesului de replicare, genomurile rezultate se asociază cu proteina structurală, astfel încît la 6—6$^1/_2$ ore încep să apară primele particule de virus matur.

Proteinele nou formate în celula infectată sînt elaborate în două etape succesive sub acțiunea unui ARN$_m$ specific viral. Mai întîi se formează un ARN$_m$ „precoce", a cărui sinteză se face după modelul oferit de genomul

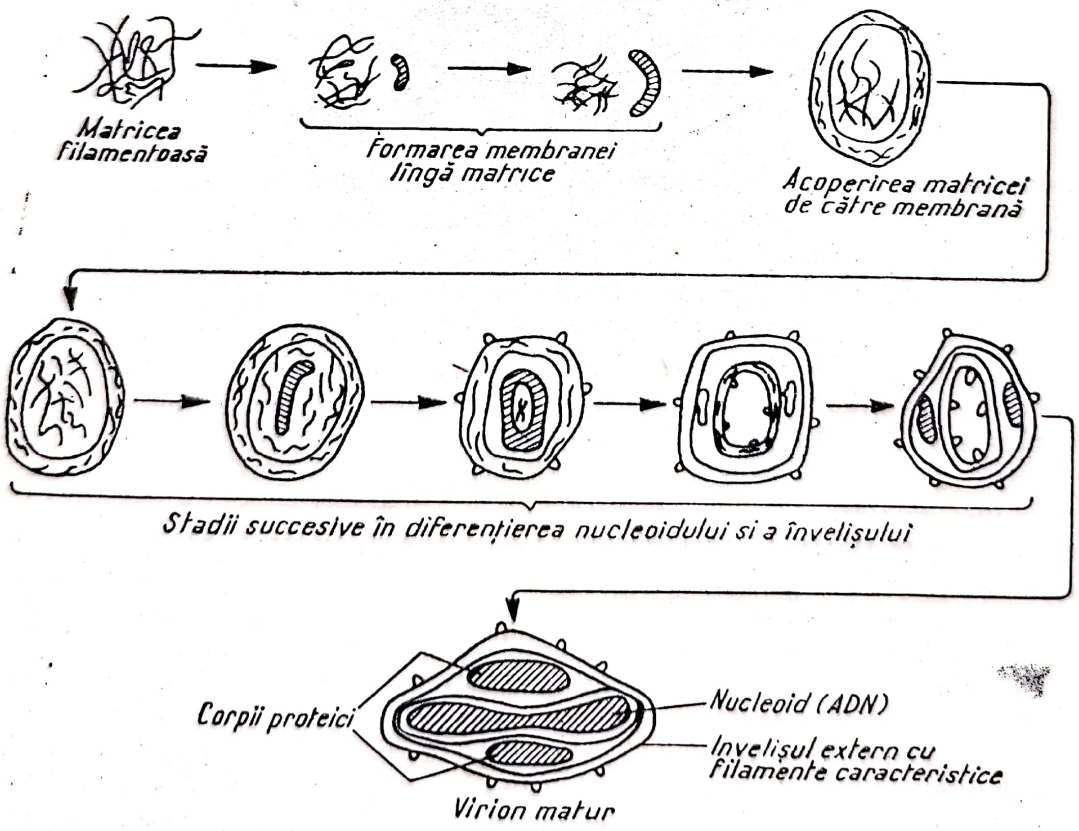


Fig. 49. Reprezentare schematică a procesului de biosinteză a virusului vaccinal (după Avakyan).

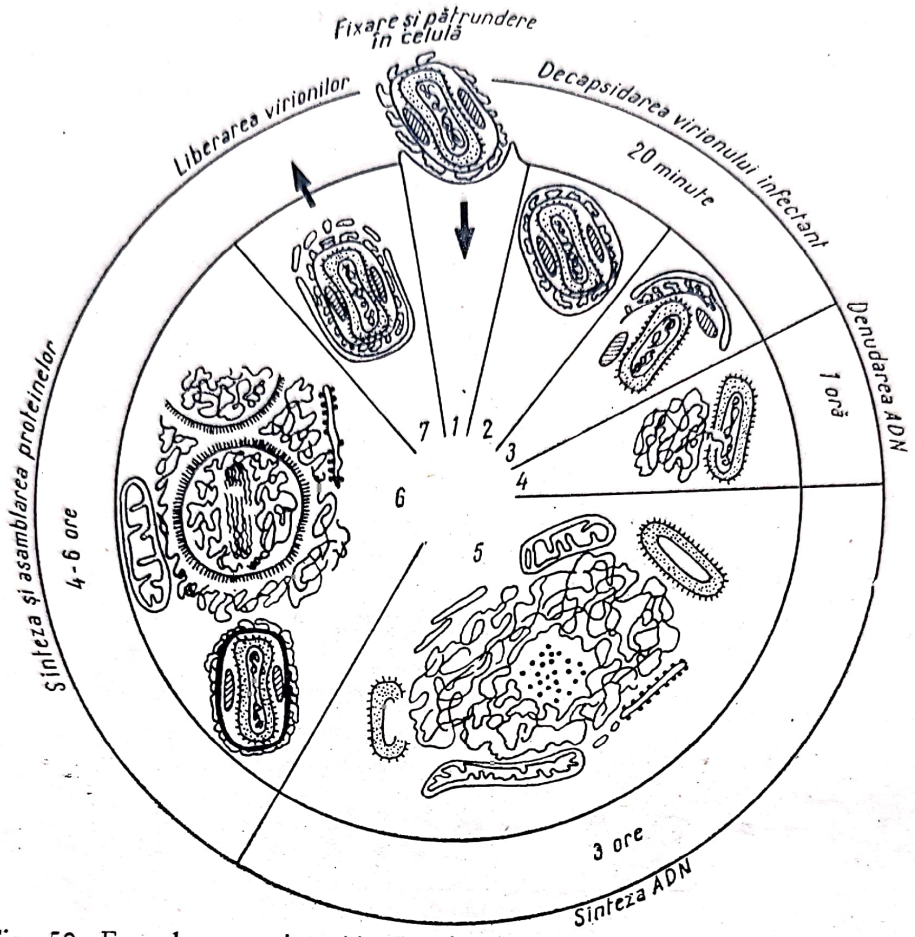


Fig. 50. Etapele succesive (*1—7*) ale procesului de biosinteză a virusului vaccinei într-o celulă infectată (după Dales).

parental (ADN „dezgolit" al virusurilor pătrunse în celulă prin infecție). Acest ARN_m „precoce" acționează în prima etapă de formare a proteinelor virale, și anume dirijează, între altele, sinteza unei ADN-polimeraze, enzimă implicată în replicarea ADN viral, deci în formarea unui număr mare de genomuri progene. La rîndul lor, genomurile virale progene servesc ca model pentru formarea unui ARN_m „tardiv". Acesta codifică în primul rînd formarea unei enzime care inactivează ARN_m „precoce" (la 3—4 ore de la infecție) și apoi declanșează cea de-a doua etapă în sinteza proteinelor virale, aceea în care sînt elaborate subunitățile structurale, care vor alcătui capsida.

Maturarea virusului durează pînă la 16—20 de ore de la infecție, cînd $^1/_3$—$^1/_2$ din moleculele progene de ADN sînt închise în particule mature de virus, iar celula conține circa 10 000 virioni dispersați în diferite regiuni ale citoplasmei.

— *Cinetica replicării intranucleare a virusului herpesului.* Timpul necesar pentru replicarea unei molecule ADN viral este de astă dată de maximum 40 de minute. După cum s-a dovedit experimental, ADN viral se acumulează într-un interval de 4—14 ore de la infecție, în vecinătatea unor agregate granulare, la a căror periferie se observă corpusculi de aproximativ 100 Å, care ar putea corespunde capsomerelor.

Primele particule de virus apar la 4 ore după infecţie şi ar fi „nude", adică lipsite de peplos şi neinfecţioase sau slab infecţioase. După Falke, ele ar trece apoi din nucleu în citopasmă, antrenînd şi cîte o porţiune din membrana nucleară care ar deveni astfel învelişul (peplosul) virionului matur infecţios.

După Epstein particulele de virus imatur „nud", fără înveliş, dispuse în nucleu sub formă de mase mari cristaline sau ca entităţi individuale diseminate dezordonat, ar trece în citoplasmă şi s-ar acumula acolo în jurul unor vacuole citoplasmice care aparţin probabil aparatului Golgi. Împingînd membrana vacuolară, particula virală ar determina invaginarea „în deget de mănuşă" a acesteia către lumenul vacuolei, acoperindu-se astfel în întregime cu porţiunea invaginată, după care s-ar detaşa împreună cu aceasta, căzînd în cavitatea vacuolei sub formă de virus matur „învelit". Particulele virale care la ieşirea din nucleu au ajuns spre periferia celulei şi-ar constitui peplosul pe seama membranei citoplasmatice. Cum membrana nucleară, membrana sistemului vacuolar alcătuind aparatul Golgi şi membrana citoplasmatică aparţin aceluiaşi sistem anatomo-funcţional, este de presupus ca virusul să poată folosi pe oricare dintre ele pentru formarea învelişului său extern.

9. RELAŢII ÎNTRE VIRUSURI ŞI CELULA-GAZDĂ PARAZITATĂ

a. Caracterizarea complexelor virus-celulă

După infectarea celulei-gazdă şi „dezgolirea" lui, AN viral blochează biosintezele celulare normale şi dirijează totalitatea activităţilor metabolice ale celulei spre producerea de constituenţi virali. Datorită acestui fapt, celula parazitată de un virus nu mai poate fi privită ca sediul reacţiei între două sisteme biologice separate şi distincte, ci trebuie concepută ca o unitate rezultată din integrarea acestor sisteme, în care genomul viral controlează procesele genetice şi metabolice ale celulei-gazdă, în vederea perpetuării parazitului.

După pătrunderea AN viral în celula-gazdă, există două posibilităţi de evoluţie virus-celulă, în funcţie de modul în care virusul se integrează în ritmul biologic al celulei.

1) *Starea independentă (complexul virus-celulă independent)* corespunde situaţiei în care virusul nu se supune mecanismelor de reglare a celulei, ci se replică într-un ritm propriu, diferit, determinat de genele virale.

În această stare, în funcţie de viteza sintezei de material viral, de nivelul acumulării lui în celulă şi de gradul lui de interferenţă cu activitatea genomului celular, există, de asemenea, două alternative de evoluţie:

a) *Complexul independent citocid (interacţiunea virus-celulă cu efect citocid)*, care este condiţionat de replicarea independentă a AN viral şi de activitatea lui intensă avînd ca rezultat o tulburare profundă a organizării celulare în sens iniţial funcţional şi apoi anatomic; acest proces care include degradarea ADN celular, blocarea sintezei proteinelor celulare, moartea celulei

şi distrugerea ei prin liză este tipic în complexul fag virulent — bacterie sensibilă, ca şi la unele complexe virusuri — celule vegetale sau animale.

b) *Complexul independent echilibrat (steady-state)*, în care virusul se replică tot autonom dar cu o viteză foarte mică şi aproape constantă; ca urmare, tulburarea organizării celulare este mult mai restrînsă, astfel încît celula supravieţuieşte şi se multiplică, transmiţînd virusul de la o generaţie celulară la alta, vreme îndelungată sau chiar indefinit; un exemplu tipic pentru acest gen de relaţie este acela al sistemelor virus oncogen — celulă-gazdă.

2) *Starea dependentă (complexul dependent)* corespunde situaţiei în care AN viral este supus mecanismelor de reglare ale celulei-gazdă şi, ca urmare, se replică sincron cu ADN celular. În acest caz, virusul este „dependent" de celulă, iar aceasta supravieţuieşte numai atît timp cît virusul rămîne în stare dependentă. Relaţia de acest fel este tipică în complexul fag temperat — bacterie lizogenă.

b. Virulenţa virusurilor

Studiul complexelor virus-celulă a permis o caracterizare a virulenţei virusurilor, respectiv a capacităţii lor de a determina leziuni, semne de boală şi uneori chiar moartea celulei şi a organismului, după ce au provocat o infecţie. Virulenţa virusului nu poate fi considerată — corect vorbind — ca o proprietate a virusului *per se*, ci ca o rezultantă a proceselor intracelulare determinate de interacţiunea virus-gazdă infectată. Virulenţa este deci o noţiune relativă, care exprimă interacţiunea unei populaţii standard de virus cu o anumită gazdă. Ea este raportată de obicei la tipul genetic comun al virusului (tipul sălbatec) şi la tipurile comune de celule-gazdă.

1) *Virusurile virulente* au capacitatea de a produce cu celulele sensibile numai complexe citocide (ca, de exemplu, fag litic — bacterie lizosensibilă sau virus — celulă animală). Ele se comportă astfel deoarece genomul lor posedă informaţia genetică pentru sinteza în celula-gazdă a unor enzime care distrug componenţii esenţiali ai celulei (ADN) sau blochează sinteza ADN şi ARN celular.

2) *Virusurile moderate* au proprietatea de a forma cu celula-gazdă complexe independente sau complexe dependente echilibrate (de exemplu, fag temperat — bacterie lizogenă sau virus oncogen — celulă animală). În anumite situaţii însă, în funcţie de celula-gazdă sau de condiţiile de mediu ale acesteia, asemenea virusuri pot manifesta şi ele un efect citocid.

c. Patologia celulelor animale infectate de virus

Celulele animale prezintă unul din următoarele tipuri de răspuns la infecţia virală: *1*) degenerare şi moarte; *2*) transformare neoplazică prin leziuni proliferative; *3*) supravieţuire fără transformare dar cu semne de prezenţă a unuia sau mai multor constituenţi virali. În culturi de celule, prezenţa infecţiei virale

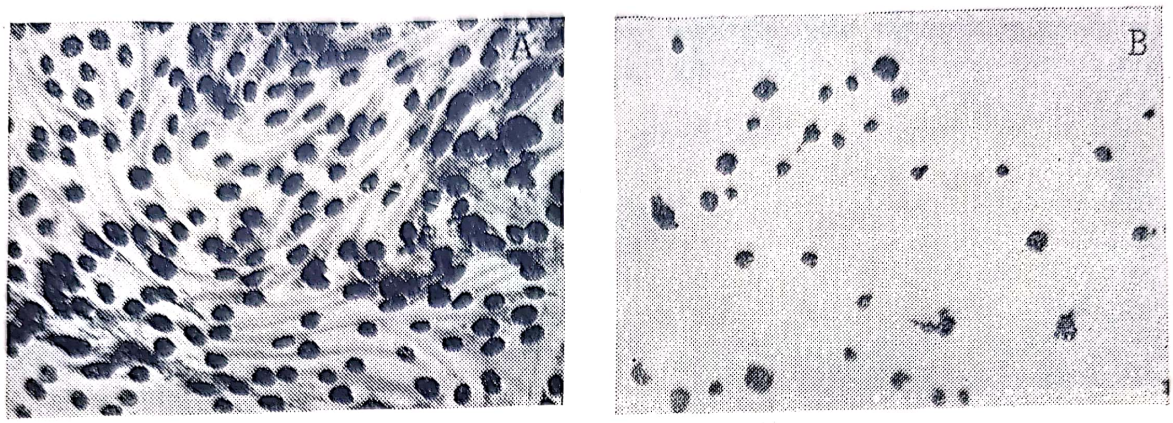


Fig. 51. Cultură normală de celule din rinichi de maimuță, dispuse în strat monocelular (*A*) și după 18 ore de la infectarea ei cu poliovirus (*B*) (după Beale).

se traduce prin două manifestări patologice caracteristice: efectul citopatic și plajele.

1) *Efectul citopatic* constă din modificări morfologice, observabile la microscopul fotonic, induse în celulele receptive în urma replicării virusurilor.

În unele cazuri, efectul citopatic este caracteristic pentru un anumit virus, prin natura celulelor afectate, sediul și caracterul leziunilor etc., astfel încît el dă indicații pentru identificarea virusului. În ceea ce privește caracterul leziunilor produse de virus, gama de modificări ale aspectului normal al celulelor este foarte largă: *a*) contractarea celulelor afectate, care devin mai mici, se rotunjesc și prezintă o citoplasmă granulată (*arbovirus*); *b*) mărirea celulelor însoțită de rotunjirea lor, creșterea refringenței și apariția tendinței la agregare în grupuri (*adenovirus*); *c*) vacuolizarea citoplasmei (*virusurile vacuolante*, de exemplu *SV40*); *d*) transformarea unor celule în elemente gigante multinucleate (*herpes*) sau, în cazurile extreme, apariția unor modificări degenerative care duc la distrugere celulară și la liză, deci efect citocid (*enterovirus*). Se adaugă diferite alte tipuri de alterări citoplasmatice sau nucleare cu diferite grade de intensitate, ca: alterări ale cromatinei nucleare sau ale nucleolilor, alterări ale aparatului Golgi și mitocondriilor, formarea

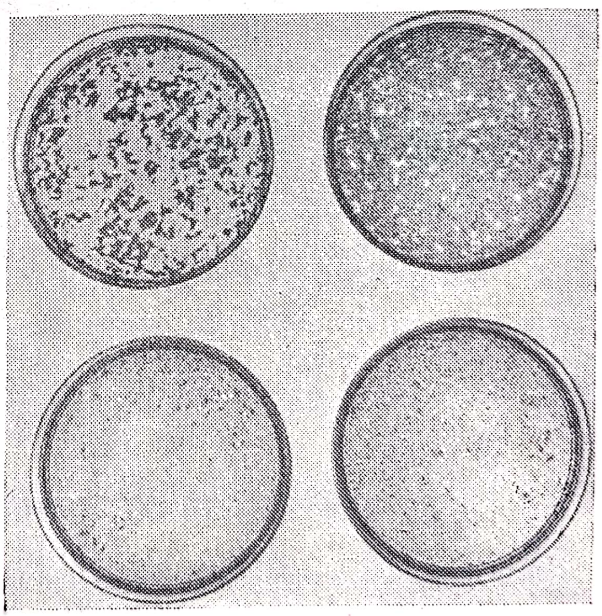


Fig. 52. Formarea plajelor în culturi monocelulare după inocularea cu virus. *Sus: stînga* — distrugere aproape confluentă datorită numărului mare de celule infectate; *dreapta* — cultură cu aproximativ 100 plaje infectate cu suspensie virală 1:10; *jos: stînga* — circa 10 plaje după diluție 1:100; *dreapta* — absența plajelor — plăci martor neinfectate cu virus (după Rapp și Melnick).

Scanned with OKEN Scanner

de sinciţii, apariţia unor incluzii caracteristice etc. Modificările morfologice sînt însoţite de efecte metabolice, ca de exemplu cele legate de inhibarea activităţii glicolitice a celulei.

2) *Plajele* reprezintă o modificare a culturii de celule, similară aceleia determinate de fag pe o pînză de cultură bacteriană. Ele apar ca zone clare în mijlocul unui strat confluent de celule normale şi provin din distrugerea unui număr de celule învecinate, de obicei ca rezultat al multiplicării unei singure particule virale. Capacitatea unui virus de a forma plaje este condiţionată de intensitatea modificărilor citopatice induse şi în special de amploarea distrugerii celulare. Forma şi mărimea plajelor pot furniza date utile pentru identificarea virusului.

10. SISTEMATICA VIRUSURILOR

Nomenclatura şi taxonomia virusurilor întîmpină dificultăţi mari comparativ, de exemplu, cu cele întîlnite de sistematica bacteriană. În ultimii ani au fost propuse numeroase sisteme de clasificare — folosind criterii diferite — fără să se ajungă la un acord unanim. Sistemul Lwoff-Horne-Tournier (LHT) are avantajul că îmbrăţişează întreaga lume a virusurilor şi este bazat pe criterii moleculare şi structurale bine definite. Virionul este identificat prin prisma a patru caractere considerate ca părţi esenţiale ale unui întreg: *1*) natura materialului genetic; *2*) tipul de simetrie; *3*) prezenţa sau absenţa învelişului (peplos) şi tipul de nucleocapsidă; *4*) unele date de ordin cantitativ (mărime, numărul capsomerelor etc.).

Cunoaşterea acestor caractere esenţiale definitorii permite divizarea regnului virusurilor pînă la *familie* şi clasificarea lor în cadrul sistemului în locul lor natural, adică în aceeaşi grupă cu alte entităţi biologice înrudite. Pentru subdivizarea în unităţi sistematice mai mici se folosesc criterii suplimentare. Pentru denumirea acestor unităţi se recomandă un cod de nomenclatură proprie, după sistemul binominal, dar diferit de cel folosit la bacterii. În sfîrşit, în timp ce în unele clasificări virusurile formează un regn aparte — alături de cel vegetal şi animal — sistemul LHT le grupează într-un film, fără a indica deocamdată raporturile lui cu marile unităţi sistematice ale lumii vii (tab. 3).

11. RELAŢIILE DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISMUL-GAZDĂ

Multiplicarea virusurilor animale în organism poate să producă, în funcţie de interrelaţiile dintre ele şi gazdă, patru tipuri diferite de răspuns: *infecţia aparentă* sau *boala clinică*; *infecţia inaparentă*; *infecţia latentă*; *transformarea neoplazică* prin leziuni proliferative, însoţită de apariţia de tumori.

a. Infecţia virală aparentă

Infecţia aparentă şi starea de boală prin care ea se manifestă corespund situaţiei în care multiplicarea virusului determină modificări care produc o

TABELUL 3

CLASIFICAREA VIRUSURILOR DUPĂ SISTEMUL LWOFF-HORNE-TOURNIER ŞI CRITERIILE PE CARE SE BAZEAZĂ (1962)

Crite-

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 3

CLASIFICAREA VIRUSURILOR DUPĂ SISTEMUL LWOFF-HORNE-TOURNIER ŞI CRITERIILE PE CARE SE BAZEAZĂ (1962)

Criteriile de clasificare	Tipul de material genetic	Clasa	Ordinul	Familia				
Phyllum	Subphyllum	Simetria nucleocapsidei *H*—Helicală C—Cubică *B*—Binală (complexă)	*Nucleocapsida* Neacoperită (*N*) Acoperită (*A*)	Pentru virusurile helicale — diametrul capsidei Pentru virusurile cubice — numărul de capsomere		Genul	Specia tip	Denumirea comună
Vira	DNA *Deoxyvira*	H. *Deoxyhelica*	N. — A. *Chitovirales*	100 Å	*Poxviridae*	*Poxvirus*	*variolae*	Virusul variolei
			N. *Haplovirales*	1—12	*Microviridae*	*Microvirus*	*monocatena*	Fagul Φ×174
				3—32	*Parvoviridae*	*Parvovirus*	*ratti*	Virusul şobolanului Kilham
				7—72	*Papillomaviridae*	*Papillomavirus*	*sylvilagi*	Virusul papilomului Shope
						Polyoma	*neoformans*	Virusul poliomului
		C. *Deoxycubica*		25—252	*Adenoviridae*	*Adenovirus*	*hominis*	Adenovirus
				81—812	*Iridoviridae*	*Iridovirus*	*tipulae*	Virusul *Tipula iridescens*
				?	*Inoviridae*			
			A. *Peplovirales*	16—162	*Herpesviridae*	*Herpesvirus*	*hominis*	Virusul herpesului
					Phagoviridae	*Phagovirus*	*coli* „T" *secundus*	Fag T_2 *E. coli*
		B. *Deoxybinala*	N. *Urovirales* A. —	120—130 Å	*Dolichoviridae*	*Dolichovirus*	*brassicae*	Virusul mozaicului verzei
				150	*Protoviridae*		*tabaci*	
			N. *Rhabdovirales*	200	*Pachyviridae*	*Protovirus*		Virusul mozaicului tutunului
				100—110	*Leptoviridae*			
		H. *Ribohelica*		120—130	*Mesoviridae*			
				150	*Adroviridae*			
			A. *Sagovirales*	90 Å	*Myxoviridae*	*Myxovirus*	*influenzae*	Virusul gripei
				180	*Paramyxoviridae*	*Paramyxovirus*	*parainfluenzae*	Virusul paragripal
					Stomatoviridae			
	RNA *Ribovira*					*Napovirus*	*flavicans*	Virusul mozaicului galben al napului
						Picornavirus	*aphtae*	Virusul febrei aftoase
		C. *Ribocubica*	N. *Gymnovirales*	3—32	*Napoviridae*	*Poliovirus*	*primus*	Virusul poliomielitei
						Androphagovirus	*bacterii*	Fag ARN
			A. *Togavirales*	9—92	*Reoviridae*	*Reovirus*	*mammalis*	Reovirus
					Arboviridae	*Arbovirus*	*occidentalis*	Virusul encefalitei vestice ecvine

Scanned with OKEN Scanner

alterare a stării normale — de sănătate — a organismului şi deci apariţia unor semne clinice de boală. Apariţia bolii este condiţionată de numărul de celule sensibile lezate, de distribuţia lor în diferite organe şi mai ales de atingerea unui număr critic de celule aparţinînd unui organ care joacă un rol important în viaţa organismului. Acest număr critic este, la rîndul său, condiţionat atît de abundenţa elementelor celulare din organismul respectiv (deci de rezerva celulară a organismului, cît şi, mai ales, de rolul lor în asigurarea echilibrului fiziologic al organismului. Spre exemplu, lezarea cîtorva neuroni de către virusul polio are un efect cu mult mai important decît afectarea unui număr mare de celule intestinale de către acelaşi virus. Natura virotică a unei stări patologice poate fi dovedită dacă se îndeplinesc următoarele condiţii (postulatul lui Koch-Rivers): *a*) virusul bănuit ca agent etiologic să fie intim asociat cu celulele-gazdă şi găsit totdeauna, la timpul corespunzător, în leziunile specifice ale bolii; *b*) produsele patologice respective — sub formă de filtrate amicrobiene — injectate experimental la animale sensibile să producă o îmbolnăvire caracteristică; *c*) sîngele sau extractele tisulare filtrate ale animalelor infectate experimental să transmită boala în serie la animale normale.

Virusurile pot să pătrundă în organism prin diferite „porţi de intrare", cum sînt: celulele sensibile ale căilor respiratorii, tubul digestiv, leziuni ale tegumentelor şi mucoaselor sau înţepături de artropode (insecte şi căpuşe) etc. După o perioadă de multiplicare la „poarta de intrare", virusul este vehiculat în organism la diferite organe situate la distanţă, în special pe două căi: sanguină şi nervoasă.

1) *Transmiterea pe cale sanguină* — prin viremie — este întîlnită în virozele cu exantem (rujeolă, variolă, varicelă etc.), în poliomielită şi în encefalite. Trecerea virusului în sînge ar avea loc la nivelul capilarelor limfatice sau s-ar produce prin extinderea directă a infecţiei la celulele endoteliale ale capilarelor sanguine *din* sau *de lîngă* leziunea iniţială. Transportul lui pe această cale spre celulele sensibile s-ar face prin intermediul leucocitelor. În unele cazuri, virusurile sînt încorporate de celulele sanguine polimorfonucleare şi se multiplică în interiorul acestora, ceea ce le asigură transportul la distanţă, deci diseminarea în organism. Viremia evoluează în general în perioada de incubaţie, durează în primele zile de boală şi încetează de obicei în momentul în care în sînge apar substanţe protectoare specifice — anticorpi — elaborate de organism.

2) *Transmiterea pe cale nervoasă*, prin reproducere virală activă de-a lungul axonilor, a fost demonstrată iniţial pentru virusul herpetic (centrifug), apoi pentru cel rabic (centripet) ş.a.; procesul prin care ea se realizează a fost numit *septinevrită*. Datele mai noi par să infirme acest mod de transmisie în special în ceea ce priveşte nervii periferici, deoarece înmulţirea intranucleară a virusului herpetic face puţin probabilă transmiterea lui prin axoni. El ar fi localizat în special în celulele lui Schwann şi în cele endoneurale care înconjură cilindrul ax. Este posibil ca rolul principal în transmiterea virusului pe calea nervilor periferici să-l aibă capilarele limfatice şi sanguine perineuronale.

Ajunse la nivelul celulelor sensibile, virusurile pătrund în interiorul acestora, se multiplică acolo şi determină apariţia unor manifestări anormale, uneori foarte evidente, care au o importanţă deosebită pentru diagnosticul infecţiei corespunzătoare

Aceste manifestări patologice pot fi *locale*, atunci cînd leziunile afectează un număr limitat de celule dintr-o anumită regiune a organismului infectat, sau *generale*, în care caz sînt mult mai complexe, datorită marii diferenţieri morfofuncţionale a celulelor şi ţesuturilor atinse.

Leziunile locale se datoresc fie localizării stricte a virusului numai în cîteva celule, fie faptului că acţiunea lui se manifestă pregnant doar la un număr mic de celule, deşi el este prezent dincolo de limitele reacţiei locale. Caracterul localizat al infecţiei virale poate fi determinat de factori ca: posibilitatea limitată de răspîndire a virusului, existenţa unui număr redus de celule receptive sau stabilirea unui echilibru între forţele de apărare ale organismului şi puterea de invazie a virusului.

Leziunile locale produse de virusurile zoopatogene apar fie la „poarta de intrare" a virusului în organism (de exemplu, leziunea vaccinală situată pe ugerul vacii sau pe mîna mulgătorului), fie la nivelul localizării secundare a unui virus circulant, ca în cazul leziunilor locale de exantem din variolă, varicelă, rujeolă. În acest din urmă caz, virusul din sînge se localizează în piele, invadînd şi lezînd celulele stratului bazal al epiteliului, ceea ce se traduce, de exemplu, în variolă şi varicelă, prin formarea unor vezicule tipice în grosimea pielii. Substratul anatomic al acestor leziuni îl constituie distrugerea unora dintre celulele lezate, însoţită, pe de altă parte, de o proliferare celulară la care se adaugă leziuni inflamatorii nespecifice.

Leziunile localizate pot fi situate şi în ţesuturile profunde, generînd, de exemplu, distrugerea neuronilor motori din coarnele anterioare ale măduvei spinale în poliomielită, sau a neuronilor din „cornul lui Ammon" în rabie.

Incluziile virale sînt neoformaţii produse de unele virusuri într-o anumită proporţie din celulele parazitate. Forma incluziilor poate fi rotundă, ovalară, piriformă sau neregulată, iar dimensiunile lor sînt cuprinse între 1 şi 30 μ, ceea ce le face vizibile la microscopul fotonic. Unice sau multiple, ele sînt dispuse intracitoplasmatic (vaccină, rabie, oreion), intranuclear (herpes, varicelă, polio) sau intracitoplasmatic şi intranuclear (variolă, zona zoster etc.). În stadiile precoce, incluziile sînt bazofile şi pot fi Feulgen-pozitive, datorită predominanţei acizilor nucleici în constituţia lor; în stadii mai tardive, ele devin acidofile. În ceea ce priveşte semnificaţia lor biologică, incluziile virale nu reprezintă constituenţi celulari cu caracter static, ci corespondenţi morfologici ai procesului dinamic prin care celula produce virus (Buddingh). În stadiile iniţiale de dezvoltare a infecţiei celulare, aceste incluziuni reprezintă adevărate colonii de virus. Ulterior ele sînt lipsite de virus infecţios, dar indică prin localizarea lor sediile celulare ale procesului de producere a virusului. Datorită acestui fapt, prezenţa unor asemenea incluzii reprezintă un indicator preţios pentru demonstrarea naturii virale a unor leziuni, iar morfologia şi dispoziţia lor caracteristică în anumite celule constituie un important criteriu de diagnostic în unele viroze. Astfel, punerea în evidenţă a incluziilor rabice

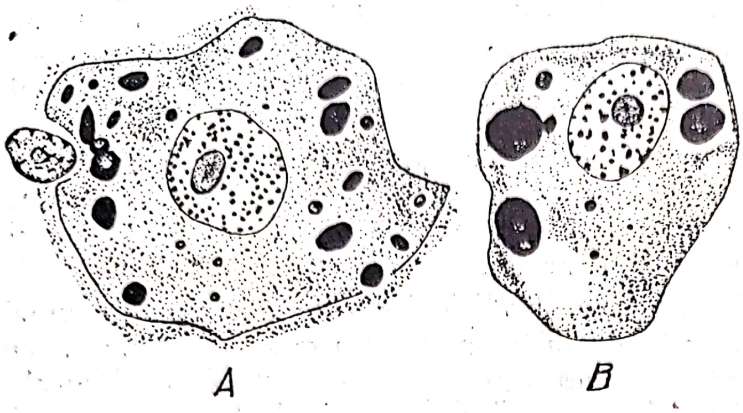


Fig. 53. Incluzii virale. Neuroni (*A*, *B*) conţinînd corpusculii lui Babeş-Negri (după Nicolau).

— *corpusculii lui Babeş-Negri* — în neuronii din „cornul lui Ammon", permite precizarea diagnostioului de turbare la omul şi animalele suspectate de a fi murit în urma acestei boli.

Modificările generale produse de virusurile zoopatogene sînt foarte variate şi complexe, datorită marii diferenţieri funcţionale a celulelor lezate. Caracterul complex al acestor leziuni explică o serie de particularităţi proprii bolilor virotice ca incubaţie de durată relativ fixă, febră, alterări ale stării generale, tulburări ale diferitelor metabolisme etc.

b. Infecţia virală inaparentă

Unele infecţii virale sînt lipsite de manifestări evidente, au o durată limitată şi încetează în mod obişnuit după un anumit interval de timp, datorită eliminării virusului din organism (fapt care le deosebeşte de infecţiile latente caracterizate prin persistenţa îndelungată a virusului). Caracterul inaparent al infecţiei se datoreşte în mod obişnuit faptului că localizarea şi multiplicarea virusului — care uneori poate fi totuşi masivă — se produc în celule care nu aparţin acelor organe a căror afectare determină semnele caracteristice ale bolii. Spre exemplu, poliovirusul poate produce infecţii inaparente la nivelul intestinului, însoţite de eliminarea virusului prin fecale; organismul purtător al unei asemenea infecţii rămîne aparent sănătos, întrucît poliomielita ca boală exteriorizează infecţia şi prezenţa leziunilor consecutive în sistemul nervos central.

c. Infecţia virală latentă

Infecţia latentă se caracterizează printr-o evoluţie fără manifestări de boală şi o durată îndelungată sau chiar cronică, pentru tot restul vieţii organismului, datorită stabilirii unui echilibru între gazdă şi parazit. Acest tip de infecţie a fost descris în raport cu o serie de virusuri animale (hepatită, anemia infecţioasă a cailor, leucoze aviare).

1) *Infecţiile latente ale plantelor verzi,* foarte răspîndite în natură, sînt periculoase prin aceea că generează rezervoare de virus fitopatogen ignorate

şi, ca atare, practic imposibil de combătut. Importanţa lor practică este determinată de pagubele pe care le pot produce prin extinderea infecţiei la plantele de cultură. Astfel, *Cuscuta campestris* poate prezenta infecţii virale latente transmisibile la peste 100 alte specii de plante sensibile.

2) *Infecţiile latente ale atropodelor* pot fi produse de virusuri fitopatogene (virusul mozaicului cerealelor la *Delphax striatella,* virusul răsucirii frunzelor de cartof la *Myzus persicae,* virusul mozaicului porumbului la *Peregrinus maitidis*) sau de virusuri ale animalelor (virusurile febrei papataci la flebotomi, ale encefalitelor la ţînţari şi căpuşe etc.). Insectele şi acarienii se infectează de obicei înţepînd organismele bolnave. Infecţia rămîne latentă, dar este însoţită de multiplicarea virusului care poate fi transmis prin înţepătură la organisme sensibile noi, astfel încît antropodele joacă rolul unor transmiţători vii sau vectori.

3) *Infecţiile latente ale animalelor de laborator,* larg răspîndite în crescătorii, au o mare importanţă datorită faptului că denaturează rezultatele infecţiilor experimentale. În adevăr, infecţiile latente pot fi reactivate de o infecţie experimentală supraadăugată, evoluînd paralel sau interferînd cu ea în diferite modalităţi şi grade, ceea ce face imposibilă evaluarea exactă a rezultatelor.

Din această categorie fac parte viroza glandelor submaxilare şi pneumopatia cobailor, choriomeningita infecţioasă a şoarecelui cenuşiu *(Mus musculus),* pneumonia şoarecelui etc.

4) *Infecţiile latente ale omului* sînt similare acelora ale animalelor de laborator. Cea mai bine studiată dintre ele este herpesul recurent, care îşi are originea într-o infecţie iniţială survenită la copil sub formă de gingivostomatită evidentă sau de infecţie inaparentă, în funcţie de sediul multiplicării virusului: anumite celule ale mucoasei bucale, ganglionii limfatici sau ganglionii senzoriali, locali. Nu se ştie dacă în aceste localizări virusul supravieţuieşte sub formă de virioni maturi *inactivi* sau de subunităţi înzestrate cu potenţialul de a iniţia un nou proces infecţios. Sub influenţa a diferiţi factori care modifică echilibrul gazdă-parazit (iradiere cu U.V., febră, tulburări digestive, infecţii respiratorii, stimuli endocrini ca menstruaţia etc.), infecţia este reactivată şi devine astfel clinic evidentă, determinînd leziunea cutanată caracteristică. Existenţa infecţiilor inaparente şi latente demonstrează că virusurile sînt *potenţial* şi *nu obligatoriu* patogene, aşa cum erau considerate în trecut.

d. Tropismul virusurilor

Tropismul sau afinitatea virusurilor pentru anumite specii (*genotropismul*), pentru anumite ţesuturi (*histotropismul*) sau pentru anumite celule (*citotropismul*) reprezintă o proprietate biologică importantă, deoarece determină particularităţile de patogenitate ale virusurilor, ale celor animale în special. Astfel, în timp ce unele virusuri (virus vaccinal ,virus rabic), pot infecta un număr mare de specii animale (cu condiţia utilizării unei doze suficient de ridicate), altele (poliovirus, virus gripal) sînt limitate *în condiţii naturale* numai

la o singură gazdă (omul). Afinitatea virusurilor pentru anumite ţesuturi se determină în general prin injectarea intravenoasă a suspensiei infectante la un animal sensibil, urmată de cercetarea prezenţei virusului în fiecare organ sau ţesut în parte. În raport cu această proprietate, virusurile pot fi clasificate în următoarele categorii: *a)virusuri dermotrope* cu afinitate pentru piele şi mucoase (poxvirus); *b) virusuri neurotrope,* cu afinitate pentru sistemul nervos central (rabic, encefalitice, polio); *c) virusuri dermoneurotrope,* cu afinitate pentru piele şi sistemul nervos central (herpes); *d) virusuri organotrope* (viscerotrope) cu afinitate pentru organele interne (febră galbenă, virus denga); *e) virusuri pantrope,* cu afinitate pentru celulele sistemului reticuloendotelial etc.

Este de menţionat însă că, în unele cazuri, localizările considerate ca definitorii pentru tropismul unui virus reprezintă o fază finală în patogeneza infecţiei virale respective. Astfel, poliovirusul este în mod esenţial un enterovirus, adică un virus enterotrop, cu afinitate pentru intestin (care şi constituie poarta lui de intrare în organism) dar, vehiculat prin sînge la nivelul sistemului nervos central, el infectează şi lezează neuronii motori, ceea ce determină caracterul său neurotrop.

Citotropismul poate fi definit drept capacitatea unui virus de a se multiplica mai activ într-un tip de celulă decît în altul. Deşi virusurile sînt citotrope prin definiţie — fiind parazite intracelulare obligate — această particularitate se manifestă cu precădere pentru anumite celule, de exemplu celule cu cariochineze frecvente — normale sau patologice — sau cu anumită localizare, structură sau funcţie. Spre exemplu, poliovirusul nu se poate multiplica în orice celulă nervoasă, ci numai în neuronii motori din coarnele anterioare ale măduvei. Această afinitate este determinantă pentru manifestările clinice ale bolii, care este caracterizată prin paralizia muşchiilor din teritoriul corespunzător neuronilor distruşi.

12. IMUNITATEA ÎN VIROZE

Procesele de imunitate care asigură apărarea organismelor faţă de infecţie implică, în mare, intrarea în acţiune a două categorii de mijloace de luptă împotriva agentului infecţios: pe de o parte, *reacţiile celulare* manifestate prin fagocitoză şi inflamaţie, iar pe de altă parte *răspunsul umoral,* tradus prin elaborarea anticorpilor, substanţe protectoare specifice. Fagocitoza nu participă la procesul de apărare antivirală, ceea ce contrastează cu importanţa ei demonstrată în cazul infecţiilor bacteriene. Prezenţa virusului nu determină afluxul leucocitelor sau al altor celule cu proprietăţi fagocitare, probabil datorită faptului că virusul intracelular nu reprezintă un stimul pentru funcţia acestor celule. În schimb, fagocitele apar secundar, după distrugerea celulelor sub acţiunea virusului sau atunci cînd s-au produs infecţii bacteriene supraadăugate. Ele au deci un rol important în procesul de vindecare a bolii, prin aceea că îndepărtează resturile celulare sau elimină infecţia bacteriană asociată. Datorită particularităţilor biologice ale virusurilor, anticorpii nu pot repre-

zenta un factor major în vindecarea unei infecţii virale. În adevăr, anticorpii nu pot pătrunde în celulele infectate, astfel că virusurile nu sînt expuse la acţiunea anticorpilor decît în faza lor extracelulară, în cursul viremiei; cum de multe ori transferul particulelor virale de la o celulă la alta se face direct, virusul rămîne şi în acest caz la adăpost de acţiunea anticorpilor. Anticorpii antivirali au însă în general capacitatea de a apăra organismul faţă de o reinfectare cu virusul omolog. În vindecarea infecţiilor virale, un rol deosebit îl joacă răspunsul febril, reacţiile inflamatorii şi interferonul.

Interferonul

Descoperirea interferonului de către Isaacs este legată de studiul fenomenului de interferenţă: celulele animale şi vegetale, precum şi bacteriile infectate cu un virus devin rezistente la suprainfectarea cu alte virusuri. Ulterior s-a demonstrat că acest efect este determinat, la animale, de prezenţa unei substanţe de natură proteică (gr. mol. 63 000) numită interferon. Acesta este o substanţă antivirală, elaborată de celulele vertebratelor supuse acţiunii unui virus şi care are proprietatea de a inhiba prin mecanisme neimunologice dezvoltarea altor virusuri în celulele în care s-a format sau în celulele care au venit în contact cu ea. Prezenţa interferonului a fost detectată iniţial în celule tratate cu un virus inactivat, ceea ce demonstrează că producerea lui nu este condiţionată de multiplicarea virusului, ci de liberarea în celulă a unui constituent al particulei virale (probabil a acidului său nucleic). Ulterior s-a demonstrat că producţia de interferon este totuşi mult mai mare sub acţiunea virusului infecţios dar atenuat.

După formarea sa, interferonul este liberat în mediu şi poate proteja celulele normale de acţiunea virusului. Un interferon preparat într-un anumit sistem celular (de exemplu, celule pulmonare de şoarece) şi cu un virus dat (de exemplu, virus gripal) este activ în acelaşi sistem celular pe un număr mare de virusuri neînrudite serologic cu virusul inductor, dar activitatea sa maximă se manifestă faţă de grupul de virusuri căruia îi aparţine acesta. Interferonul nu distruge şi nici nu inactivează virusul. El acţionează numai intracelular, inhibînd replicarea acidului nucleic viral după desfacerea capsidei. Acţiunea sa s-ar exercita indirect, printr-o alterare a metabolismului celular, al acizilor nucleici şi al proteinelor virale, în urma căreia virusul infectant dispare din celulă.

Semnificaţia biologică a interferonului. Inducţia producerii de interferon, ca şi virulenţa, nu reprezintă o proprietate izolată a virusului, ci un mod de comportare al unui virus în raport cu o anumită populaţie de celule. De aceea nici nu există o corelaţie pozitivă între inducţia de interferon şi virulenţă. Aşa se explică de ce un anumit virus (de exemplu, virusul pestei aviare) este foarte virulent pentru embrionul de găină şi pentru puiul de găină, la care producerea de interferon este foarte redusă, şi slab virulent pentru celulele umane, în care însă induce formarea masivă de interferon.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 54. Acţiunea antivirală a interferonului. Aspectul unei culturi celulare infectată cu virus: zonele albe corespund regiunilor în care celulele au fost distruse (*A*); tratarea cu interferon permite dezvoltarea normală a culturii de celule (*B*).

Aplicaţii practice. Numeroase fapte de observaţie care demonstrează rolul interferonului în vindecarea infecţiilor virale pledează pentru eventuala lui utilizare în terapeutică, în special ca factor de rezistenţă celulară în infecţiile respiratorii şi de suprafaţă. În pneumonia gripală a şoarecelui există un paralelism strîns între procesul de supravieţuitori şi concentraţia interferonului în pulmon; animalele care mor, practic nu au interferon în pulmoni. Cercetările în acest domeniu nu au depăşit însă stadiul unor încercări experimentale, încă nu de ajuns de concludente.

13. VIRUSURILE ONCOGENE

Transformarea malignă (cancerizarea) posibilă pentru aproape toate tipurile de celule diferenţiate reprezintă în termeni biologici o manifestare a modificării uneia dintre proprietăţile cele mai generale ale celulelor organismelor superioare, şi anume capacitatea de adaptare a vitezei de multiplicare celulară la cerinţele impuse de arhitectonica de ansamblu a organismului. Modificarea malignă, care comportă pierderea acestei capacităţi, poate afecta o singură celulă care apoi se multiplică intens în stare alterată. Transformarea tumorală apare cel mai adesea la celulele care în mod normal se divid în ritm rapid, fie pentru că au viaţă scurtă, fie pentru a înlocui pe cele moarte.

Principalele caracteristici ale celulelor transformate sînt relativ bine cunoscute, graţie observaţiilor efectuate pe culturi de celule. *1*) Spre deosebire de celulele normale care se *multiplică în mod coordonat* — numai atunci cînd este nevoie — sub controlul unor stimuli naturali, celulele tumorale (neoplazice) *se multiplică anarhic, neîntrerupt*, prin diviziuni mult mai frecvente decît este normal şi independent de stimulii naturali. Ele sînt în mică măsură supuse

dispozitivelor normale de control, care „spun" unei celule cînd să se dividă. 2) Celulele normale au o *afinitate specifică* datorită căreia în organism sînt limitate, în funcţie de tipul lor, la anumite ţesuturi, după regulile de care depinde arhitectura organismului. Această afinitate este evidentă şi *in vitro*: celulele hepatice şi renale puse împreună în acelaşi mediu se agregă specific între ele pentru a reconstitui fragmente de ficat şi, respectiv, de rinichi. Celulele tumorale îşi pierd afinitatea specifică, astfel că în culturi se agregă la întîmplare cu alte celule, iar în organism invadează ţesuturi şi organe diferite în care continuă să prolifereze. 3) În culturi, celulele normale *au afinitate mare pentru suprafeţele solide* — se fixează pe sticlă — şi se divid regulat, aproximativ o dată la 24 de ore, atît timp cît cultura dispune de spaţiul necesar pentru extinderea ei în suprafaţă. 4) Cînd se formează un strat monocelular în care elementele sînt aproape confluente, ia naştere probabil un „semnal" chimic care opreşte extinderea individuală a celulelor şi, adesea, şi diviziunea lor: *fenomenul de inhibiţie de contact*. Celulele tumorale au o afinitate mărită pentru celelalte celule şi, ca atare, creşterea lor nu încetează atunci cînd ajung în contact, ci continuă, elementele cresoînd unele peste altele pentru a forma mase compacte de celule suprapuse (microtumori), astfel încît aspectul de strat monocelular regulat al culturii dispare. (tab. 4). Aceste particularităţi se reflectă în caracterele generale ale tumorilor canceroase.

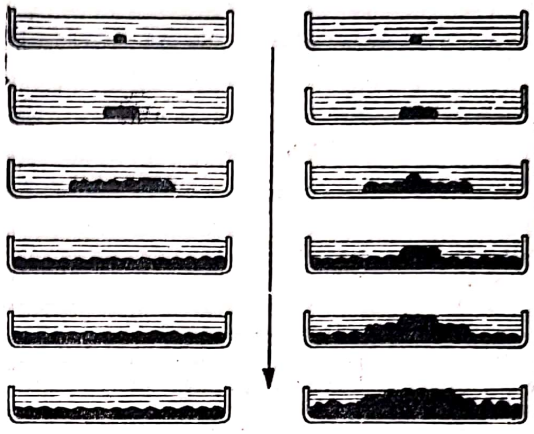


Fig. 55. Caracteristicile de multiplicare pe o suprafaţă solidă ale unor culturi de celule normale, comparativ cu celulele canceroase (după Watson).

Tumorile maligne, canceroase sau *neoplasmele* sînt în general nedelimitate, imobile şi aderente faţă de ţesuturile subiacente, au formă neregulată şi arborizaţii (datorită tendinţei lor de a invada, de a se infiltra şi de a distruge activ ţesuturile din jur). Ele tind să producă *metastaze* (tumori secundare) prin implantarea la distanţă a celulelor tumorale în alte organe, după o perioadă de diseminare hematogenă. Sub raport morfologic ele prezintă modificări caracteristice, datorită prezenţei unor mitoze foarte frecvente şi cu caracter anormal şi alterării arhitecturii normale a ţesutului respectiv. De asemenea ele produc tulburări metabolice profunde ale organismului şi au, spre deosebire de tumorile benigne, o evoluţie malignă care se termină prin moarte. Cercetările efectuate pe culturi de celule au arătat că, o dată apărută, transformarea malignă a celulei este ereditară în sensul că toţi descendenţii celulei respective, în culturi de celule sau într-un organism, vor avea acelaşi caracter malign. Această comportare a dus la ipoteza unei alterări cromozomice care, teoretic, s-ar realiza pe trei căi: *a*) prin acumularea unor mutaţii apărute la nivelul unor celule somatice, mutaţii care dezorganizează un dispozitiv de reglare a diviziunii celulare (de exemplu, prin pierderea unui fragment funcţional din materialul genetic al celulei; *b*) printr-o diferenţiere anormală ireversibilă; *c*) prin participarea unui virus — respectiv a unui genom străin — capabil să dezorganizeze activitatea vitală a celulei infectate.

TABELUL 4

CARACTERISTICILE DIFERENŢIALE ALE CELULELOR NORMALE ŞI ALE CELULELOR CARE AU SUFERIT O TRANSFORMARE MALIGNĂ

Comportare		Celule normale	Celule transformate
În culturi de celule	Multiplicare	Coordonată, determinată de stimuli naturali	Anarhică, independentă de stimulii naturali
	Inhibiţia de contact	Prezentă	Absentă
	Orientarea în cursul creşterii	Regulată; celulele fuziforme se dispun paralel	Neregulată; celulele se dispun la întîmplare
	Stratificare	Monostratificare (strat monocelular)	Pluristratificare sau formare de colonii (microtumori)
	Conservarea caracteristicilor cromozomiale	Stabilitate cromozomială	Instabilitate cromozomială; tendinţa la anomalii şi aneuploidie
	Eficienţa formării de clone în subculturi	Mică	Mare, chiar pornind de la suspensii diluate de celule
	Acidifierea mediului	Slabă	Puternică (activitate glicolitică intensă)
În organismul receptor	Afinitatea specifică pentru organul sau ţesutul omolog (de origină)	Conservată, ca şi *in vitro*	Pierdută; invadarea unor ţesuturi şi organe heterologe
	Acţiune tumorigenă	Absentă	Prezentă; manifestată la 30 de zile după inocularea a 10^6 celule la un organism sensibil

Ipoteza originii virale a tumorilor emisă în 1903 de Borrel, a fost confirmată în 1910 de Peyton Rous şi în 1932 de Shope, care au demonstrat transmisibilitatea prin extracte acelulare a tumorilor care le poartă numele. În prezent, se cunosc cel puţin 40 de virusuri oncogene la amfibieni, păsări şi mamifere, între care: *1*) virusul sarcomului lui Rous, *2*) virusul mixomului sau papilomului lui Shope, tumoră malignă foarte contagioasă în natură la iepurele sălbatic, *3*) virusul carcinomului mamar al şoarecelui, care apare numai la femelele adulte după gestaţie şi se transmite la pui prin laptele matern; *4*) virusul simian vacuolant (SV40), prezent în stare latentă în rinichiul de maimuţă, nepatogen pentru gazda sa naturală, dar oncogen pentru hamster.

Tumorile virale umane cele mai frecvente sînt *negii* sau *verucile* care apar pe dosul mîinii, în jurul unghiilor, în regiunea plantară sau perineală. Ele se

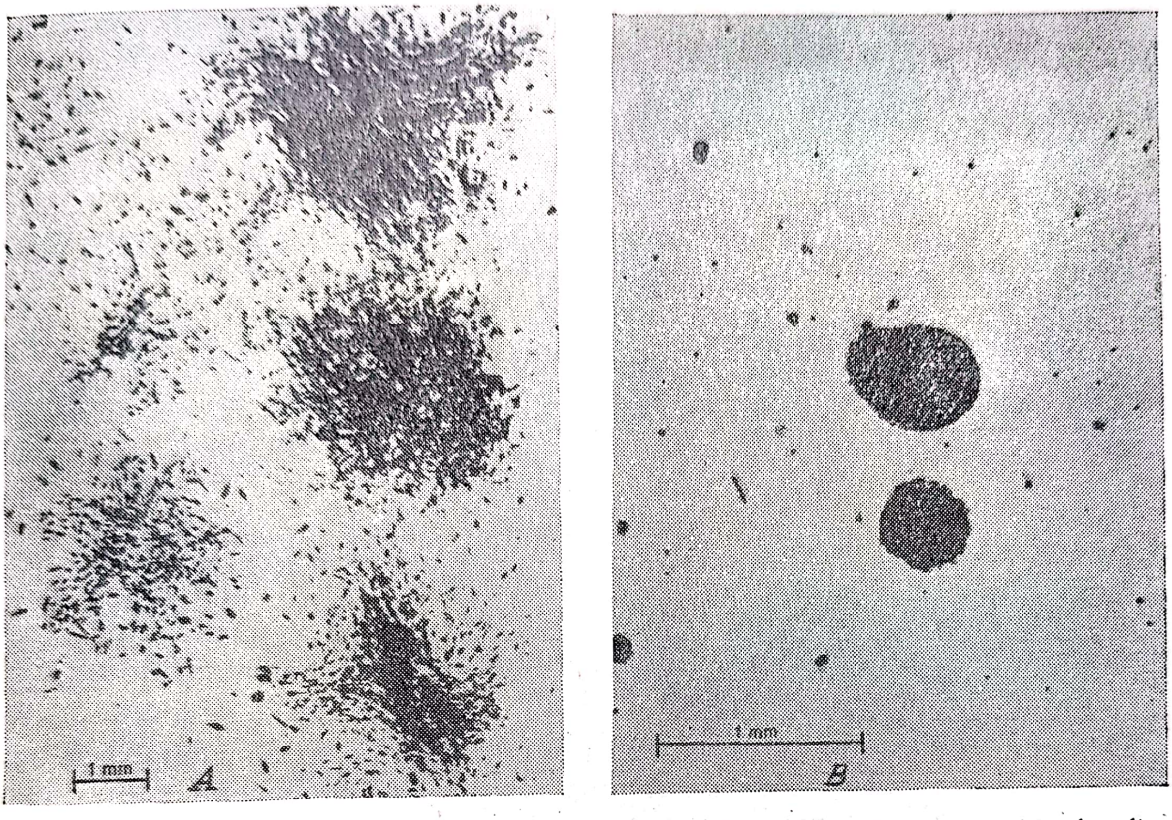


Fig. 56. Transformarea encogenă virală: *A* — colonii de fibroblaşti infectaţi cu virusul poliomului; colonia densă neregulată din centru provine dintr-o celulă transformată; celelalte conţin celule normale; *B* — colonii de celule tumorale în fază înaintată de dezvoltare; celulele normale nu s-au mai dezvoltat (după Stoker).

transmit prin zgîrieturi şi înţepături (de exemplu, de foarfece), prin contact cu apă contaminată (la baie şi la ştrand), sau prin contact sexual. Dacă nu sînt îndepărtate, aceste tumori — la origine benigne — se pot maligniza. *Molluscum contagiosum* este o altă tumoră virotică a pielii, frecventă pe trunchi, pleoape şi în regiunea anogenitală. Agentul patogen este un virus cu ∅ 220 mμ, care pătrunde pe cale pilosebacee şi produce tumorete de cîţiva milimetri pînă la un centimetru, care evoluează spre vindecare spontană.

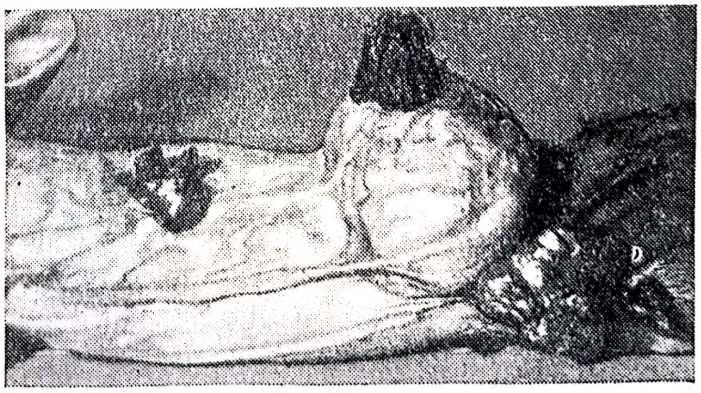
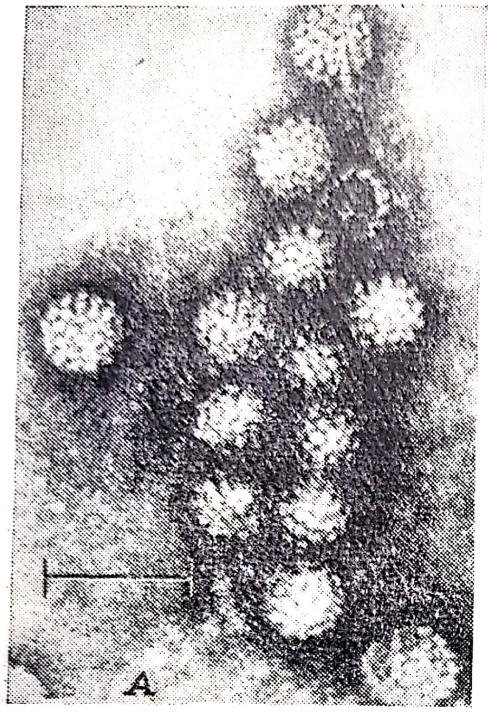


Fig. 57. Tumoră de origină virală la iepure.



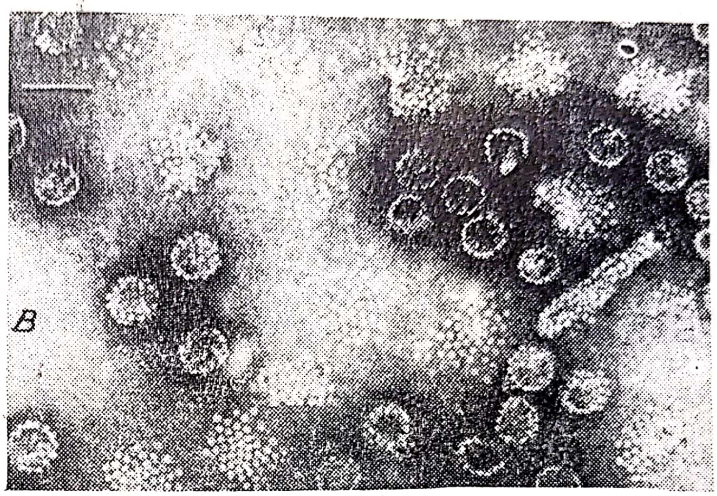


Fig. 58. Virusul papilomului Shope (*A*); capside golite de genom (*B*) (după Anderson).

Deşi cercetări recente au adus date privind originea virală a unor boli maligne — ca leucemiile — nu există pînă acum nici o probă fără echivoc asupra naturii virale a tumorilor maligne umane, datorită imposibilităţii de a se izola din ele un virus oncogen infecţios.

Mecanismul oncogenezei virale a fost descifrat în ceea ce priveşte două tumori ale animalelor (poliomul şi sarcomul Rous). S-a dovedit în cazul acestor tumori că transformarea malignă rezultă dintr-o modificare la nivel molecular, indusă în mod similar indiferent de natura virusului. Aceasta a contribuit la înţelegerea faptului că, deşi unele tumori ar putea fi de origine virală, izolarea virusului oncogen infecţios este în prezent imposibilă.

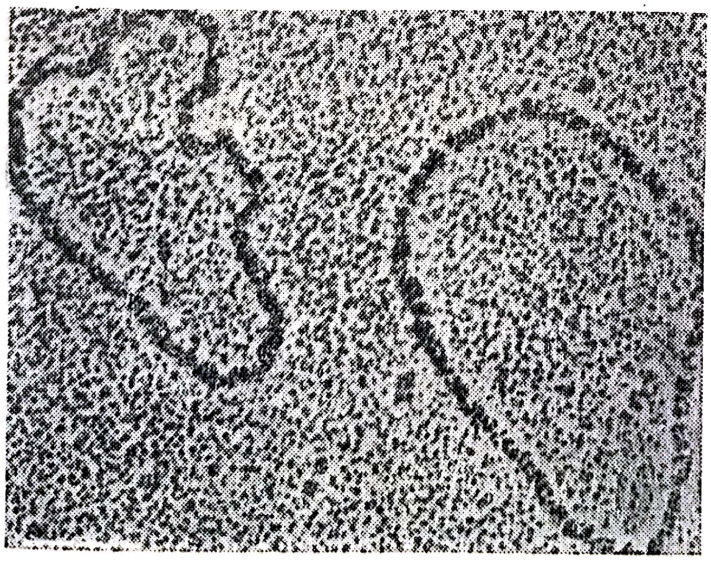


Fig. 59. Genomul circular (ADN) al virusului polionului (după Lapus şi Blair).

a. Oncogeneza datorită virusului poliomului (virus ADN)

Virusul poliomului constă dintr-un virion „sferic" cu diametrul de 500 Å şi gr. mol. $2{,}5 \times 10^7$. Capsida sa este formată din 72 unităţi de proteină, fiecare constituită din subunităţi mai mici, şi închide un genom alcătuit dintr-o moleculă unică, circulară de ADN dublu catenar avînd în stare relaxată un diametru de 1,6 μ şi o gr. molec. de 3×10^6 daltoni. Gazda naturală a acestui virus este şoarecele. Virusul induce formarea de tumori cu caracter malign, provocînd moartea la şoarece, şobolan şi hamster şi cu tendinţă de regresiune spontană la cobai şi iepure.

Infecţia unei celule normale prin virusul poliomului ca şi aceea a bacteriilor printr-un fag temperat poate evolua în două moduri diferite:

1) Cel mai adesea, virusul se multiplică în nucleul celulei-gazdă, cu formarea a milioane de virioni, alterează forma normală a nucleului şi distruge celula-gazdă, ceea ce reprezintă *efectul citocid* corespunzător infecţiei litice prin fag virulent. Acest mod de comportare a virusului în relaţie cu gazda sa se exteriorizează în cultura de celule prin apariţia de „plaje", porţiuni ale culturii de unde celulele de şoarece au dispărut complet. Ciclul de replicare virală durează în acest caz 24 de ore, şi este însoţit de producerea şi liberarea masivă de virus matur: celula infectată este de tip *productiv*.

2) Mai rar, virusul pătruns în celulă nu reuşeşte să induca formarea de noi virioni şi, ca urmare, efectul citocid lipseşte. În schimb, cu o frecvenţă foarte mică de 1—2 celule la cîteva milioane de particule virale, el poate determina o infecţie care nu afectează viabilitatea celulelor, dar induce „transformarea" lor malignă: celulele respective se multiplică dezordonat, îşi pierd afinitatea pentru suprafeţele solide, cresc liber în mediu şi formează grupuri de celule îngrămădite neregulat, unele peste altele. În asemenea proliferări celulare virusul nu poate fi pus în evidenţă întrucît celulele transformate nu produc şi deci nu eliberează

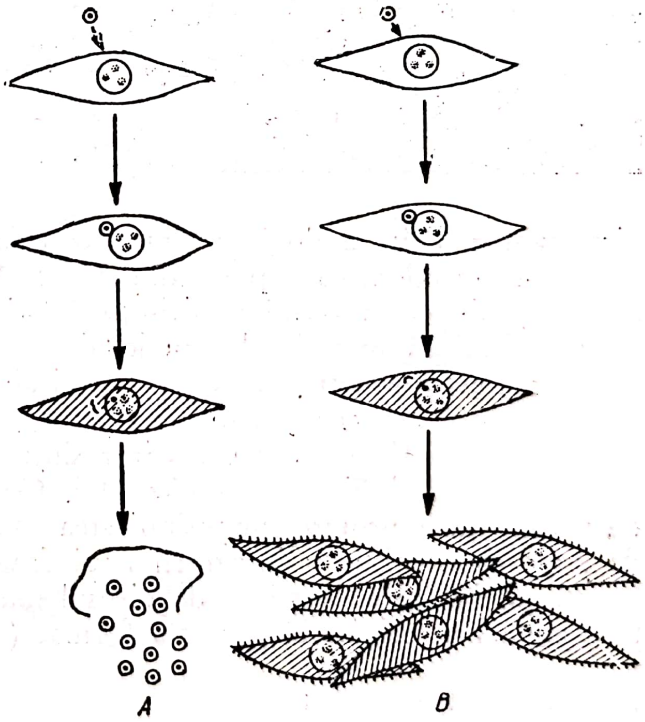


Fig. 60. Acţiunea virusurilor asupra celulelor-gazdă invadate: *A* — infecţie virală „productivă" însoţită de formarea de particule virale progene complete, urmată eventual de moartea celulei şi liberarea virusului; *B* — infecţia virală care determină „transformarea" celulelor invadate — fără producere de particule virale. Celulele haşurate au funcţii noi induse de genomul viral. Modificarea suprafeţei celulelor tumorale indică prezenţa unor modificări de structură antigenică specifice virusului (după Dulbecco).

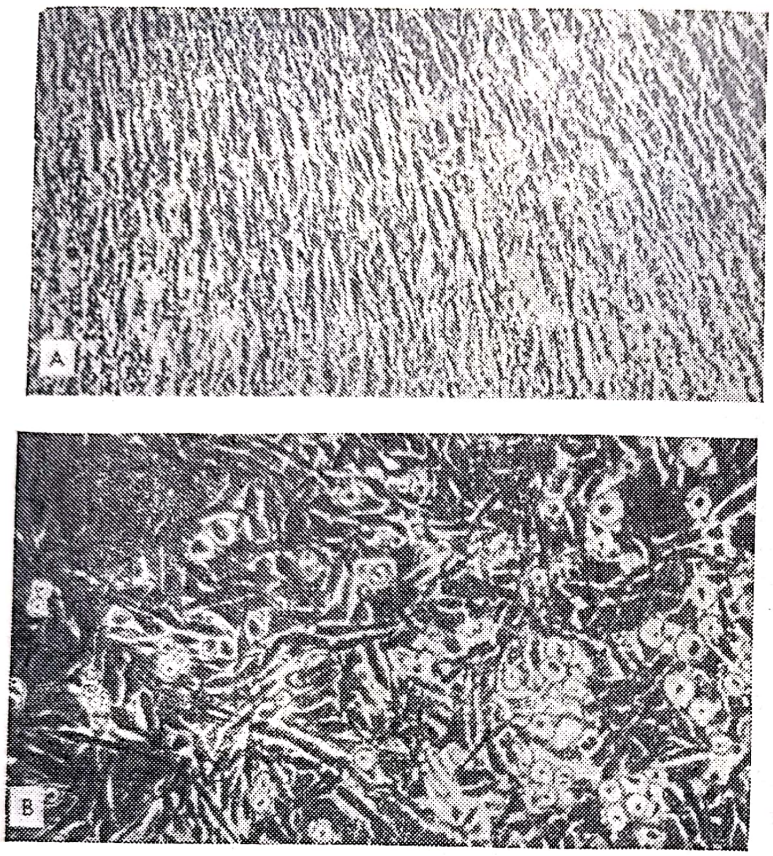


Fig. 61. Cultură de celule normale de embrion de hamster, în strat monocelular, orientate paralel înainte (*A*) și după transformarea malignă sub influența virusului poliomului: celulele apar suprapuse și orientate la întîmplare (*B*) (După Dulbecco).

virus matur. Prin analogie cu integrarea fagului lizogen în genomul bacteriei-gazdă, se consideră că o parte din ADN al virusului poliomului ar fi integrat într-unul din cromozomii celulei-gazdă prin recombinare (*crossing-over*).

O dovadă că materialul genetic al celulei de șoarece poate fi suplimentat cu un material genetic exogen o constituie faptul că în celulele transformate în urma infecției cu virusul poliomului apar substanțe proteice de tip nou (antigenul specific tumoral), a căror sinteză nu a putut fi codificată decît de ADN aparținînd virusului poliomului. Condiția „transformării" neoplazice o constituie, prin urmare, imposibilitatea maturării virusului în anumite celule, de unde eventualitatea integrării unui fragment din genomul său în genomul celulei-gazdă. Spre deosebire de virusul matur, care prin eliberarea sa produce totdeauna liza celulei în care s-a format (efectul citodic), ADN viral integrat

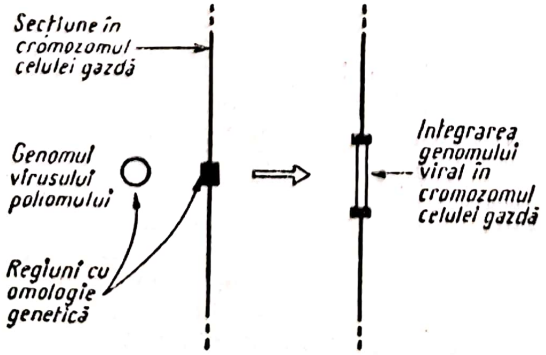


Fig. 62. Reprezentare schematică a modului de integrare a cromozomului virusului poliomului în cromozomul celulei-gazdă — proces realizat prin rupere simultană a celor doi cromozomi la nivelul unor regiuni omologe și reunirea lor prin extremitățile rămase libere (după Watson).

în genomul celulei-gazdă nu determină liza acesteia, ci transformarea ei malignă, perpetuată din generaţie în generaţie celulară pnîă la constituirea tumorii care va evolua în continuare cu aceleaşi caractere de malignitate.

Analiza genetică a virusului poliomului a arătat că genomul său conţine circa 5 000 de baze corespunzînd capacităţii de a codifica circa 1 700 de aminoacizi. Dintre lanţurile polipeptidice formate, aproximativ $^1/_3$—$^1/_4$ corespund proteinelor virale structurale. Restul de 1 200 de aminoacizi (circa 4—8 proteine) participă la declanşarea procesului intracelular de infecţie şi de transformare (R. Dulbecco). Transformarea tumorală poate fi indusă şi de ADN viral purificat. Capacitatea virusului poliomului de a induce transformarea malignă a celulelor-gazdă este foarte mică: în medie sînt necesare 1 milion de particule virale pentru a transforma o singură celulă, deşi transformarea propriu-zisă este iniţiată numai de un fragment de ADN provenit de la un singur virion. Această comportare explică de ce virusurile tumorale pot fi prezente în organismul gazdelor lor naturale vreme îndelungată, fără ca să inducă formarea de tumori.

b. Oncogeneza datorită virusului sarcomului Rous (virus ARN)

Virusul sarcomului Rous face parte din grupul mixovirusurilor. Virionul este alcătuit dintr-un complex ARN-proteină flexibil, acoperit de o mem-

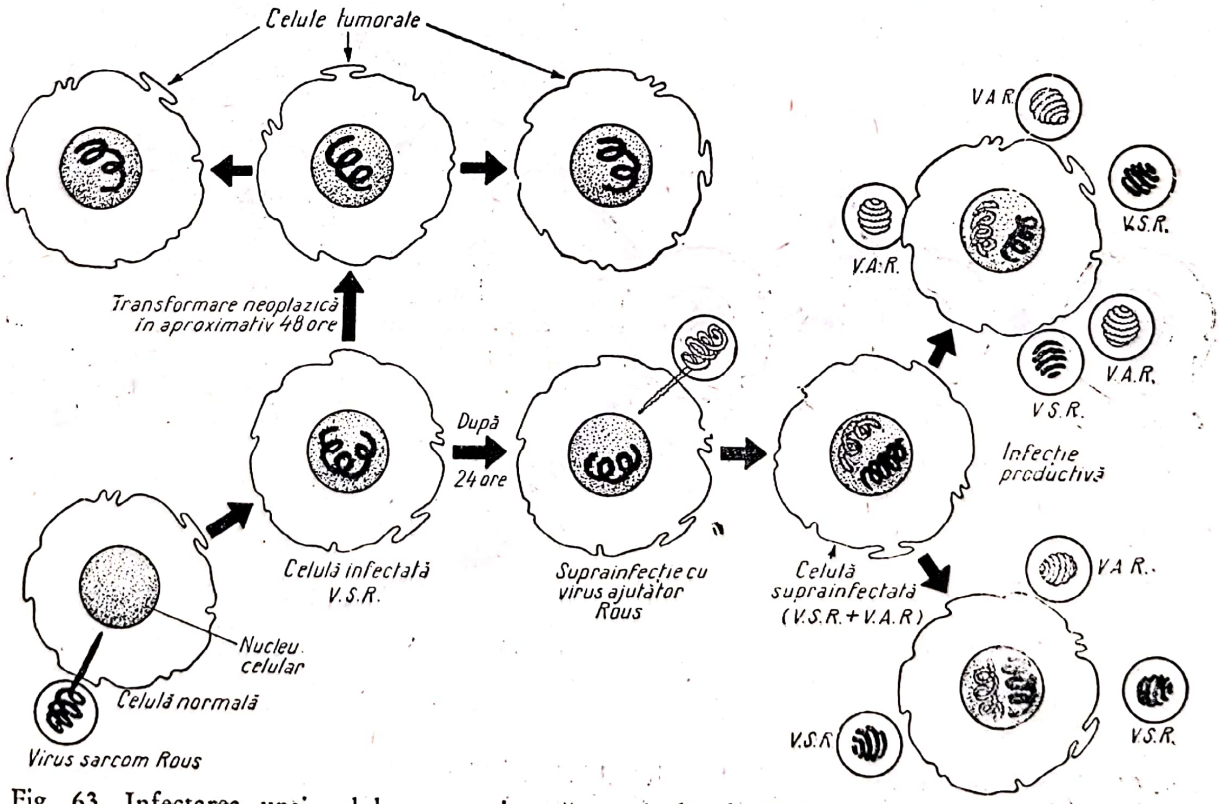


Fig. 63. Infectarea unei celule cu o singură particulă de VSR determină transformarea ei malignă prin introducerea informaţiei genetice virale în genomul celular, fără producere de virus. Dacă celula este suprainfectată cu un virus ajutător (VAR), infecţia devine productivă, cu biosinteza de virioni ai ambelor tipuri de virus (VSR şi VAR).

brană lipo-proteică şi închis într-o capsidă formată dintr-un număr mare de subunităţi proteice. La acest virus, ARN conţine circa 30 000 de nucleotide, ceea ce corespunde teoretic la circa 35 de proteine diferite (10 000 AA), deci cu mult mai multe decît intră în constituţia capsidei. Cînd celulele normale sînt infectate cu cîte o singură particulă de VSR, în circa 48 de ore ele îşi modifică forma ajungînd sferoidale şi devin invadante ca urmare a transformării neoplazice, dar sînt incapabile să producă virus matur infecţios (celule canceroase neproductive).

Dacă însă celulele normale sînt infectate cu o cantitate mare de virus, transformarea lor rapidă este asociată cu o eliminare masivă de virus. Analiza amănunţită a virusului izolat arată însă că în realitate este vorba de o asociaţie de două virusuri morfologic identice dar genetic diferite, şi anume: *1) virusul sarcomului Rous* (VSR), capabil atunci cînd este singur să inducă transformarea canceroasă a celulei normale, dar incapabil să producă liberarea de virus matur (virus neproductiv) şi *2) virusul ajutător al lui Rous* (VAR) sau, mai exact, virusurile ajutătoare, care separat nu sînt capabile

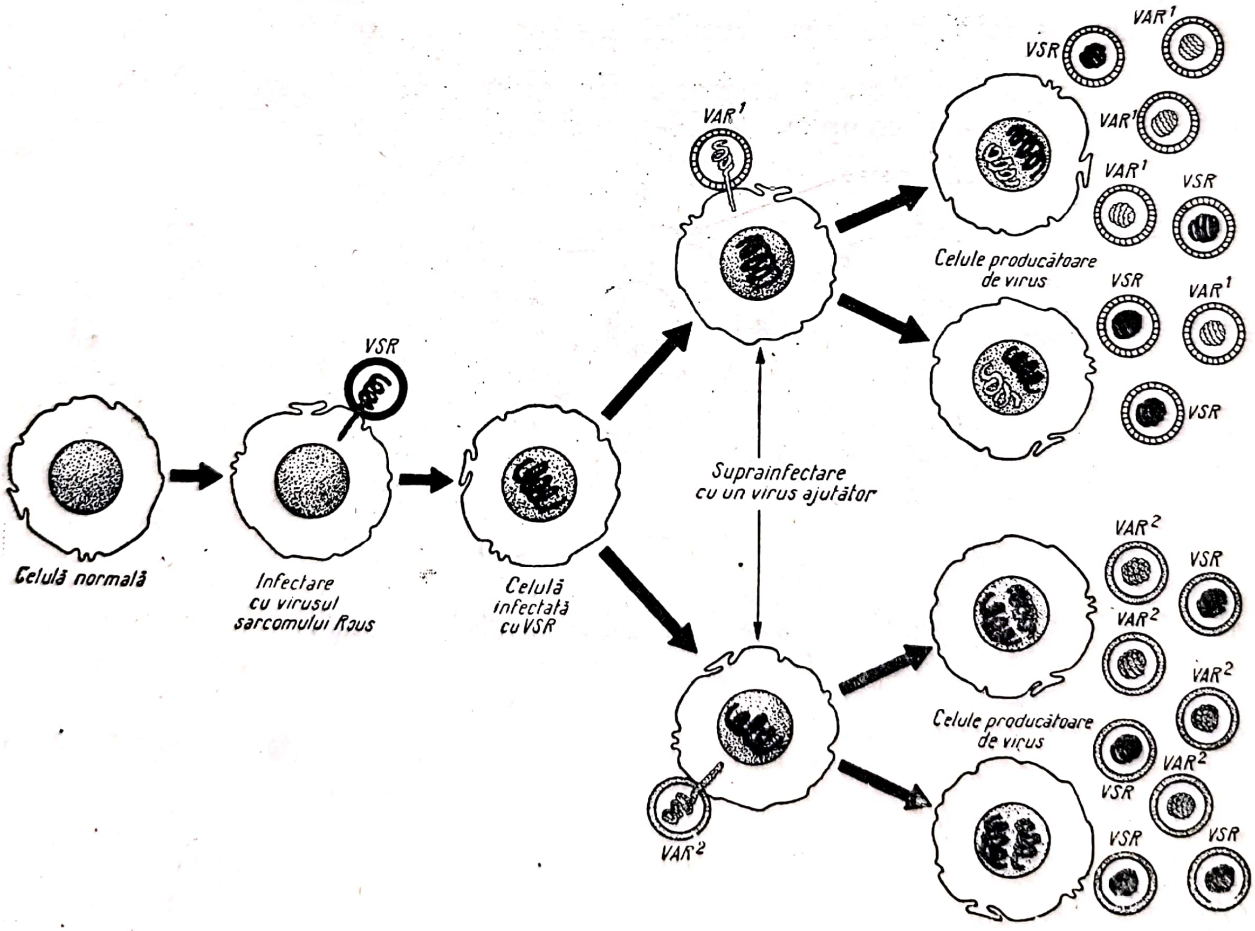


Fig. 64. Demonstrarea caracterului defectiv al VSR. Figura reprezintă schematic evoluţia suprainfecţiei cu două virusuri ajutătoare diferite (VAR_1 şi VAR_2): în fiecare din celulele producătoare de virus se realizează sinteza a două tipuri de virioni maturi corespunzînd VAR respectiv şi unor particule de VSR cu capsidă identică aceleia a VAR suprainfectant, al cărui genom a suplinit defectul genetic al virusului oncogen.

să producă o tumoră solidă, ci determină numai o boală de tip leucemic a sîngelui (limfomatoza aviară).

VSR, care singur reușește să transforme celulele normale dar nu se poate reproduce sub formă de noi virioni, este un virus defectiv, deoarece — datorită unui deficit de informație genetică — el nu poate avea descendenți compleți, fiind incapabil să inducă în celula-gazdă sinteza proteinelor necesare capsidei. Ca urmare, genomul său rămîne „descoperit" și de aceea are o infecțiozitate foarte mică, de unde rezultă și imposibilitatea punerii lui în evidență atunci cînd infecția se face exclusiv cu el. Acest genom se replică însă în celula-gazdă, trece astfel de la o generație de celule la alta și malignizează fără să poată fi evidențiat. Malignitatea foarte mare a acestui virus pare să fie corelată cu defectivitatea lui. Caracterul defectiv al VSR este legat prin urmare de structura genomului său și se traduce prin incapacitatea acestuia de a elabora virioni maturi infecțioși, ARN viral rămînînd „descoperit".

În cazul infecției masive, cu VSR se asociază unul dintre virusurile ajutătoare, de exemplu VAR, care îi compensează defectul genetic, furnizîndu-i materialul proteic necesar pentru construcția capsidei. În felul acesta, în urma infecției asociate se izolează două virusuri diferite: *1*) VSR care conține genomul omolog VSR înconjurat de o capsidă a VAR și *2*) VAR complet, al cărui genom este îmbrăcat în propria sa capsidă. Defectivitatea VSR atunci cînd nu a fost asociat cu VAR poate să explice de asemenea de ce din unele tumori nu se poate izola virus infecțios.

Mecanismul oncogenezei virale

Transformarea malignă indusă de virusuri este inițiată de încorporarea unor gene virale în genomul celulei-gazdă și nu de pierderea ireversibilă a unei funcții celulare. Această adiție aduce un supliment de material genetic capabil să determine o transformare profundă a particularităților normale ale celulei. Țesuturile de proveniență umană pot fi infectate persistent în laborator cu diferite virusuri oncogene, dar în organism și în natură acest lucru nu pare a fi posibil. Se admite că transformări celulare induse de virus apar și în condiții naturale, din timp în timp, dar celulele transformate sînt respinse și îndepărtate de organism prin mecanismele sale de apărare (imunitate). Tumorile nu apar decît acolo unde aceste mecanisme sînt încă nedezvoltate sau cînd doze foarte mari de virus produc un număr foarte mare de transformări celulare, dintre care unele supraviețuiesc răspunsului imunologic. Reamintim că pînă în prezent nu s-a precizat — fără echivoc — natura virotică a unor tumori maligne umane. Virusurile izolate din unele tumori umane nu produc tumori la animale. De asemenea, virusul SV40 (virusul simian vacuolant), care este oncogen pentru hamster și pentru embrionul uman, nu produce tumori la omul adult, deși în ultimii ani a fost inoculat accidental cu ocazia unor vaccinări.

14. VIRUSURILE ONCOLITICE

Unele virusuri au o afinitate marcată pentru ţesuturile tumorale în care se localizează şi se multiplică, determinînd oprirea procesului de multiplicare a celulelor tumorale, apariţia unor modificări ale tumorii (necroză, ulceraţii etc.), pierderea caracterului de transmisibilitate a tumorii, prelungirea vieţii animalelor purtătoare sau chiar eliminarea ţesutului tumoral. Acţiunea oncolitică a acestor virusuri s-ar explica prin faptul că biosinteza virală ar necesita un anumit produs metabolic celular, indispensabil şi pentru dezvoltarea celulelor tumorale. În această competiţie virus-celulă, metabolitul este folosit cu predilecţie pentru formarea de virus. După Love, regresiunea prin oncoliză a tumorii nu ar fi o consecinţă directă a modificărilor morfologice şi metabolice produse de infecţia virală, ci s-ar datori faptului că aceste modificări fac celulele tumorale accesibile acţiunii fagocitelor, mărindu-le capacitatea de a stimula mecanismele locale şi generale de apărare ale gazdei.

Utilizarea în practica medicală a virusurilor oncolitice este în prezent imposibilă datorită patogenităţii lor pentru sistemul nervos: multiplicarea lor ar priva de un metabolit esenţial nu numai celulele tumorale, ci şi celulele nervoase, la nivelul cărora aceste virusuri induc apariţia de leziuni necrotice.

15. NATURA VIRUSURILOR

Problema naturii virusurilor (organisme vii sau structuri neanimate) prezintă un foarte mare interes nu numai pentru virolog, ci mai ales din punctul de vedere al biologiei generale. Pasteur considera virusurile ca microbi foarte mici, care nu pot fi evidenţiaţi cu mijloacele uzuale datorită dimensiunilor lor infime. Beijerinck le considera (1898) ca agenţi infecţioşi vii, capabili de multiplicare, dar lipsiţi de structură corpusculară *(contagium fluidum vivum)*, iar Hunger şi Bauer (1905) le asimila unui *principiu aberant* — poate o toxină — care ar lua naştere în cursul proceselor metabolice ale celulei bolnave şi care, venind în contact cu celulele sănătoase, ar exercita asupra lor un efect patologic *(contagium fluidum inanimatum)*. Păreri extreme de acest gen au fost emise şi sînt încă admise uneori, deşi cunoştinţele noastre despre virusuri sînt în momentul de faţă foarte extinse.

Dificultatea majoră rezidă în faptul că pînă astăzi nu avem o definiţie a vieţii, unanim acceptabilă (Rashevsky, 1966) şi că cele mai multe dintre definiţiile ei actuale se reduc în esenţă la o enumerare a proprietăţilor pe care biologul le identifică la un organism. Or, multe dintre aceste proprietăţi se întîlnesc şi la unele forme de organizare a materiei neanimate. Mai mult decît atît, la frontierele vieţii sau pe primele ei trepte, termenul de *viu* poate avea o semnificaţie şi o importanţă mai mică (H. F. Conrat).

O reacţie de schimb între un sistem de compuşi organici sau chiar anorganici, întreţinută continuu printr-o aprovizionare corespunzătoare cu componentele reactante, ar putea fi considerată, la rigoare, ca un caz simplu de metabolism. O astfel de reacţie „metabolică" se deosebeşte însă profund de

veritabilele reacţii metabolice ale vieţii, prin lipsa unei proprietăţi capitale a acestora, şi anume subordonarea faţă de relaţiile fundamentale dintre diferitele proprietăţi ale sistemului luat ca un ansamblu. Considerate separat, proprietăţile unui organism sînt desigur rezultante ale unor mecanisme fizico-chimice, dar sistemul în totaul este „viu" datorită relaţiilor reciproce care se stabilesc continuu între aceste proprietăţi şi între fiecare dintre ele şi ansamblul lor. Aceste relaţii fundamentale sînt în esenţă aceleaşi pentru toate organismele, fie ele simple sau complexe (Rashevsky, 1960). De aceea, proprietăţile generale ale oricărui organism viu sînt altceva decît suma proprietăţilor constituenţilor săi. După expresia lui Jacob, natura face mai mult decît o simplă însumare: *ea integrează.* Ca urmare, ceea ce determină complexitatea unui organism superior în raport cu un virus nu este complexitatea mai mare a moleculelor sale *luate izolat,* ci gradul mai înalt de organizare a acestor molecule între ele în sisteme ierarhizate la nivele diferite, fiecare dintre ele fiind corelat şi reacţionînd cu toate celelalte şi cu ansamblul lor, la rîndul lui corelat şi reacţionînd cu fiecare dintre ele (A. Szent György).

Lwoff defineşte organismul viu ca o unitate independentă de structură şi funcţii interdependente şi integrate. Sistemele biologice — organismele — sînt dotate cu continuitate genetică. Ele nu apar niciodată „de novo", ci derivă dintr-un sistem identic preexistent. Organismele sînt alcătuite în esenţă din compuşi macromoleculari, dintre care unii — acizii nucleici şi proteinele — au o structură şi funcţii specifice. Pentru ca viaţa să poată fi perpetuată, aceste macromolecule acţionează cooperant, ca un sistem specific complex şi organizat, capabil să se reproducă independent. În felul acesta, structurile şi funcţiile sînt aspecte complementare ale vieţii. Cea mai mică unitate de integrare, cooperare şi reproducere a unui ansamblu de constituenţi este celula, sistem biologic dotat cu continuitate genetică. La un nivel de organizare inferior, subcelular, se află virusurile — entităţi infecţioase capabile de reproducere numai într-o celulă-gazdă, pornind de la modelul constituit de materialul lor genetic şi folosind precursorii şi dispozitivele de sinteză furnizate de celula-gazdă. Această dependenţă absolută de o gazdă celulară justifică opinia lui Watson după care virusurile nu sînt cu mult mai „vii" decît cromozomii izolaţi.

Pentru Monod, sistemele vii sînt singurele sisteme din univers dotate cu două proprietăţi paradoxale: *1) emergenţa* — proprietatea de a reproduce şi multiplica structuri ordonate cu grad înalt de complexitate şi de a permite crearea evolutivă a unor structuri cu complexitate crescîndă şi *2) teleonomia* — proprietatea de a avea o structură şi o organizare adaptate pentru a se asigura supravieţuirea individului şi mai ales a speciei. Aceste două proprietăţi, prin care sistemele vii se deosebesc fundamental de cele neanimate, sînt strîns corelate şi nu sînt prezente dincolo de cel mai simplu sistem viu cunoscut, care este celula bacteriană. Ca atare, expresia „materie vie" este lipsită de sens, deoarece nici o structură moleculară separată dintr-un sistem viu, oricît de complexă ar fi ea — acid nucleic sau proteină — nu mai păstrează proprietăţile care sînt caracteristice sistemului (şi nu componenţilor lui izolaţi),

ci se comportă aidoma oricărei structuri moleculare organice (Lwoff). „Substanţa vie" sau „materia vie" nu poate exista separat de contextul său. Viaţa nu poate fi decît apanajul organismului ca un întreg. În spiritul acestei concepţii, este evident că virusurile, fiind lipsite de structură celulară, nu pot fi încadrate în categoria sistemelor vii, ci se comportă exact ca simple molecule organice (Lwoff).

Pe poziţii opuse se situează Luria, după care un organism este o entitate (unit element) a unei descendenţe continue, cu o istorie evoluţionară individuală. Din punctul de vedere evoluţionist, după S. E. Luria, virusul este un organism, în mai mare măsură decît un cromozom sau chiar decît o celulă din organismul unui metazoar, deşi funcţional el este mult mai puţin independent decît oricare celulă. Luria consideră drept caracter esenţial de viaţă capacitatea unui material de a reţine, după izolarea sa, o configuraţie specifică şi prin aceasta capacitatea de a putea fi reintegrat în circuitul materiei vii. El identifică „viaţa" cu capacitatea de a produce un anumit tip de organizare, specific, independent, autoreplicant. După concepţia lui — nu lipsită de exagerări — materialului genetic în general şi chiar fragmentelor de ADN bacterian apte să producă „transformarea" bacteriilor prin recombinare genetică li se poate acorda atributul de „viu".

În concluzie, se poate spune că deosebiri fundamentale despart virusurile de sistemele biologice, chiar în forma cea mai simplă a acestor sisteme reprezentată de celula bacteriană. Aceste deosebiri permit ca — în stadiul actual al cunoştinţelor — să se considere lumea virusurilor ca un grup de entităţi infecţioase patogene pentru celulă, capabile de reproducere numai sub controlul propriului lor genom, dar folosind aparatul de sinteză al celulei infectate, deci un grup de entităţi care nu au echivalent nici în lumea organismelor, nici în natura lipsită de viaţă.

16. ORIGINEA ŞI EVOLUŢIA FILOGENETICĂ A VIRUSURILOR

Există în prezent trei concepţii care încearcă să explice apariţia şi evoluţia virusurilor:

1) După Oparin, Jdanov, Svet-Moldavski ş. a., virusurile actuale sînt descendenţi direcţi ai unui *protovirus* preistoric, în raport cu care nu au suferit mari modificări evolutive. La rîndul său, acest protovirus a apărut în primele etape ale evoluţiei vieţii pe Pămînt din forme de viaţă precelulare. În absenţa unor celule-gazdă şi a unor sisteme enzimatice, virusurile primitive utilizau pentru replicarea lor aminoacizii, polipeptidele şi nucleotidele din oceanul primitiv prin simpla adiţie la structura lor a unor substanţe din mediu identice cu cele din componenţa lor. O dată cu apariţia organismelor celulare, conţinutul în produşi organici al oceanului primitiv a început să scadă, ceea ce a silit virusurile să pătrundă în interiorul celulelor, adaptîndu-se la viaţa parazitară pentru a supravieţui pe seama gazdei lor celulare.

Această ipoteză are multe elemente vagi, greu de explicat. În orice caz, între aşa-numitul *protovirus* (virusul primitiv) şi virusurile actuale există

deosebiri atît de mari încît filiaţia propusă este greu de admis. Pentru a lua un singur exemplu edificator în acest sens, protovirusul îşi lua constituenţii chimici din rezerva de substanţe organice formate la întîmplare în oceanul primitiv, iar replicarea lui se făcea în mii sau chiar sute de mii de ani, în timp ce virusul actual se multiplică în celula vie, după o cinetică bine determinată şi în numai cîteva zeci de minute sau ore.

2) După Green, Laidlaw, Boivin, Krîss ş.a., virusurile actuale îşi au originea în celulele unor microorganisme cu viaţă independentă şi reprezintă punctul culminant al unei lungi serii de transformări prin care, ca rezultat al adaptării la parazitism, microorganismele originare au suferit un proces de evoluţie regresivă.

Primind de la celula-gazdă toate substanţele de care aveau nevoie, virusurile şi-au pierdut capacitatea de a le sintetiza singure, suferind — paralel cu reducerea pînă la dispariţie a echipamentului lor enzimatic, deci a funcţiilor metabolice proprii — şi o regresiune structurală marcată. Ele şi-au păstrat numai genomul, care le asigură replicarea, şi capsida proteică destinată să-l protejeze.

Principalele argumente în favoarea acestei concepţii sînt:

a) analogia cu alte exemple de degenerare parazitară, în care procesul de evoluţie filogenetică este cunoscut;

b) simplificarea activităţilor metabolice observată şi astăzi în trecerea de la autotrofie la heterotrofie;

c) pierderea, în anumite condiţii, a unor capacităţi de sinteză la unele dintre bacteriile actuale.

Astăzi unii dintre autorii citaţi au încercat reconstituirea ipotetică a acestei evoluţii regresive, folosind pentru exemplificare, o linie evolutivă reprezentată prin unele microorganisme actuale: autotrofe → heterotrofe saprofite → saprofite condiţionat → parazite facultativ intracelulare → parazite obligat intracelulare → virus. Tranziţia istorică de la structura *celulară* la *virion* este însă greu de conceput, deoarece nu se pot imagina treptele ei intermediare şi modul concret în care s-a realizat.

3) După Bedson şi Waterson, apariţia virusurilor este posterioară aceleia a primelor celule. Ele derivă din porţiuni de genom celular — poate de cromozom bacterian — care, desprinse din cromozom şi ajunse libere în citoplasmă, au dobîndit aici o capacitate de reproducere superioară aceleia a gazdei lor celulare. Ca urmare, multiplicarea anarhică din punctul de vedere al economiei celulare a acestor particule autonome de material genetic a produs moartea celulei şi dezintegrarea ei, însoţită de punerea în libertate a particulelor progene. Acestea au supravieţuit temporar şi au căpătat proprietatea de a pătrunde în celule noi şi de a se multiplica în interiorul lor, trecînd astfel în serie de la o gazdă la alta, iniţial sub forma de acid nucleic infecţios „dezgolit", adică lipsit de un înveliş protector. Cu timpul, probabil prin adiţia de material genetic provenit din unele celule-gazdă, genomul transferat în serie a căpătat posibilitatea de a dirija sinteza de către celula infectată a unor proteine speciale din care s-a constituit capsida, care, protejînd genomul, diminuă riscurile pe care le comportă existenţa extracelulară, fie ea şi tranzitorie, şi măreşte infec-

ţiozitatea virusului, adică aptitudinea lui de a ataca în mod eficace noi celule-gazdă. Cunoştinţele actuale asupra episomilor, şi în special cele legate de rolul acestora în constituirea ecosistemului fag temperat — bacterie lizogenă aduc argumente preţioase în favoarea acestei concepţii.

Deşi toate virusurile au caractere fundamentale foarte asemănătoare, lumea lor este suficient de eterogenă pentru a i se putea atribui — după unii autori — două origini diferite: virusurile mai complexe ar putea proveni din degenerarea extremă a unor microorganisme, consecutivă parazitismului lor intracelular, în timp ce virusurile mici ar fi fragmente de acid nucleic devenite autonome faţă de genomul celulei din care provin. Aparent aceste două ipoteze sînt fundamental diferite, dar în realitate ambele admit că la originea tuturor virusurilor stă acidul nucleic al unei celule. Această celulă de origine ar fi putut fi un microorganism sau o celulă integrată într-un organism mai complex.

De altfel, însăşi existenţa actuală a două categorii de virusuri în funcţie de acidul lor nucleic (ADN sau ARN) arată că virusurile nu au apărut toate în acelaşi mod, ci au urmat cel puţin două căi de evoluţie. În ceea ce priveşte virusurile al căror genom este alcătuit din ARN — situaţie cu totul excepţională în biologie — acestea, la rîndul lor, au putut lua naştere pe mai multe căi: *1*) constituirea pe o linie separată de evoluţie a unui grup singular de elemente genetice infecţioase; *2*) derivarea din virusuri cu ADN, prin dobîndirea capacităţii de replicare de către diverşi ARN_m specifici de virus, pînă atunci sintetizaţi în celule-gazdă, pe baza matriţelor furnizate de ADN virali; *3*) multiplicarea autonomă, independentă de modelul ADN, a unor ARN_m celulari deveniţi autonomi şi capabili de replicare.

BACTERIOFAGII

Bacteriofagii sînt virusuri adaptate la parazitismul în celulele bacteriene şi care, prin multiplicarea lor, produc liza acestor celule (*bacteriofag*=mîncător de bacterii). Fenomenul a fost pus în evidenţă, în mod independent, de Twort (1915) şi d'Hérelle (1917).

1. ANATOMIA ŞI STRUCTURA MOLECULARĂ A FAGULUI

Cele mai multe lucrări privind structura fagilor au fost efectuate pe fagi din seria *T* ai *E. coli* şi în special pe grupul *T*-par (T_2, T_4, T_6), incluzînd bacteriofagi similari ca structură, proprietăţi antigenice şi genetice.

În raport cu celelalte virusuri, fagii au o structură complexă, încă incomplet elucidată mai ales în ceea ce priveşte unele aspecte de structură moleculară, de simetrie şi de semnificaţie biologică.

Particula virală, cu o greutate moleculară de $2{,}2 \times 10^8$, este alcătuită din acid nucleic (circa 60%) şi proteine (40%). Forma ei generală este asemănătoare aceleia a unui mormoloc cu un cap uşor poliedric şi o coadă.

Capul fagului este descris obişnuit ca reprezentînd o prismă hexagonală bipiramidală (gr. mol. $8{,}5 \times 10^6$), deşi unele microfotografii (Bradley) sugerează că ar fi mai curînd pleomorf. El are o lungime de 950—1 050 Å şi o lăţime de 600—800 Å. După Kellenberger forma capului la fagul T_4 este aceea de icozaedru alungit, format din două piramide ale unui icozaedru (fiecare avînd un vertex care uneşte cinci faţete) separate de două benzi ecuatoriale cu cîte 10 feţe tăiate dintr-un icozaedru, în loc de o singură bandă obişnuită. Astfel construită, spre deosebire de icozaedrul propriu-zis, care are trei tipuri de simetrie (5 : 3 : 2), capsida alungită a fagului are numai două (5 : 2). Capul fagului conţine circa 90% din cantitatea totală de proteină şi formează un adevărat dispozitiv închis, adică o capsidă, în care este inclus materialul genetic. Nu se cunosc precis, în prezent, numărul, mărimea şi aşezarea capsomerelor din structura sa (probabil aproximativ 1 000 de subunităţi cu gr. mol. 80 000). De unul din vîrfurile piramidale ale capului este legată structura cilindrică a cozii.

Coada fagului este o formaţie complexă alcătuită din mai multe proteine, diferite de cele ale capului şi grupate pentru a forma diferite structuri: teaca

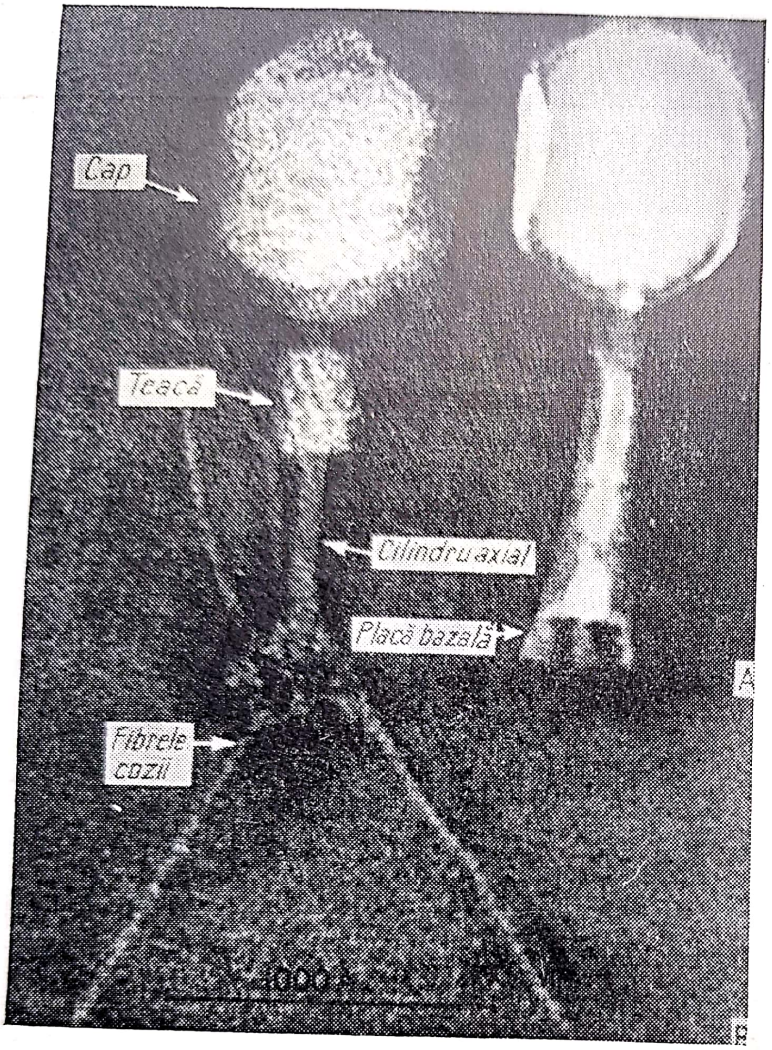


Fig. 65. Structura fagului T_2 al bacteriei *Escherichia coli:* *A* — particulă de fag intactă; *B* — particulă de fag la care contracţia tecii pune în evidenţă „sîmburele" (cilindrul axial) şi fibrele cozii (microelectronografie după Brenner).

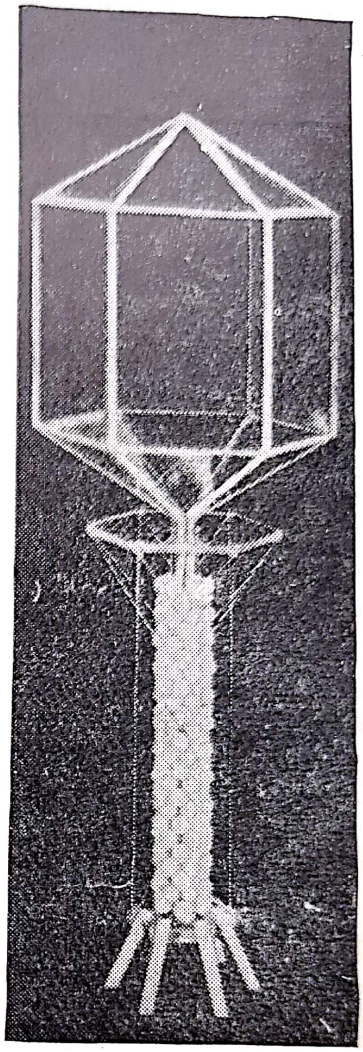


Fig. 66. Model de structură a fagilor din seria *T*-par ai *E. coli* (după Bradley).

cozii, cilindrul axial sau „sîmburele" cozii, „gulerul", placa bazală, croşetele şi fibrele cozii.

T e a c a c o z i i este o structură de forma unui cilindru gol, lung de 800 Å şi cu Ø 160 Å (gr. mol. $7{,}8 \times 10^6$—$12{,}10^6$).

În stare normală — extinsă — teaca ar fi alcătuită după B r a d l e y din 144 de subunităţi morfologice grupate în mod regulat, după un aranjament „în şurub", sub forma a 24 de inele cu simetrie radiară de tip 6. Această modalitate de aranjare cu aspect helical este demonstrată pe microelectrografii, pe de o parte, de striaţiile care se văd pe tecile cozii la fagii intacţi, iar pe de altă parte, de aspectul de roată dinţată al tecilor izolate contractate, văzute dinspre capătul lor frontal. Cînd teaca se contractă ea se scurtează aproximativ la jumătate, respectiv la 350 Å cu un Ø de 250 Å. Mecanismul cel mai

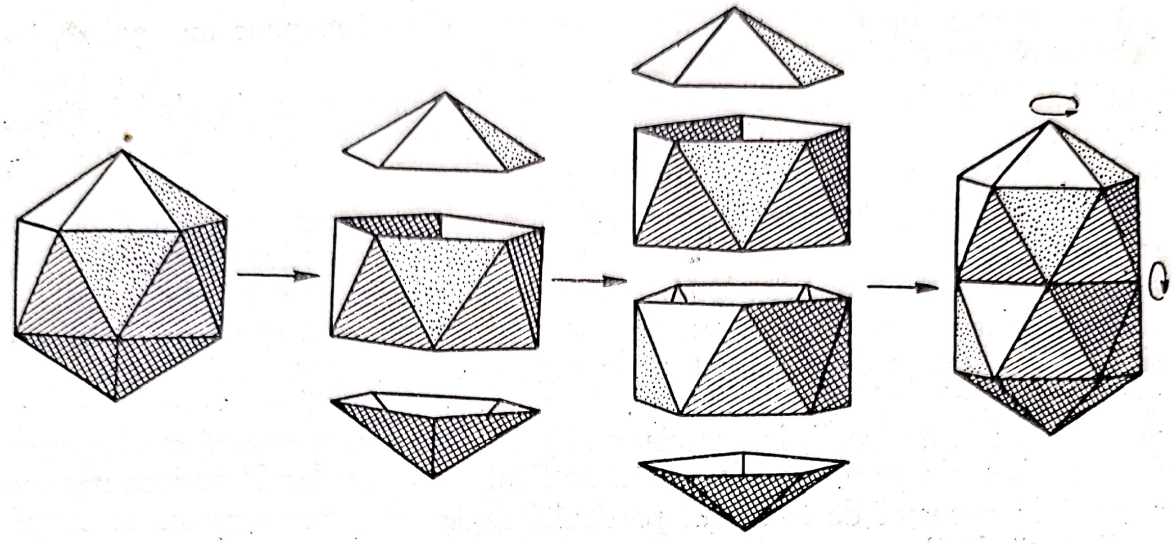


Fig. 67. Aspectul schematic şi simetria capului la fagul T_4 *E. coli*. Capsida are forma unui icozaedru alungit, provenit din legarea a două vîrfuri piramidale ale unui icozaedru regulat prin două benzi ecuatoriale cu 10 faţete (după Kellenberger).

simplu al contracţiei este acela de dublare a numărului de subunităţi (de la 6 la 12) pentru fiecare tur de spiră, numărul lor global în teaca întreagă contractată rămînînd constant. Acest fenomen — în favoarea căruia pledează microscopia electronică — s-ar realiza prin alunecarea fiecărui inel de 6 subunităţi în interstiţiile unui inel de deasupra lui.

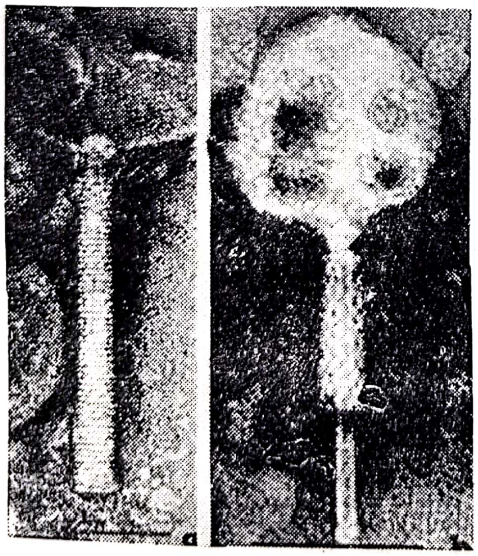


Fig. 68. Bacteriofag *Serratia marcescens*. Se observă coada fagului cu teaca extinsă pe care se disting striaţiunile cozii (*a*) şi o teacă în contracţie, lăsînd să se vadă cilindrul axial (*b*) (după Anderson).

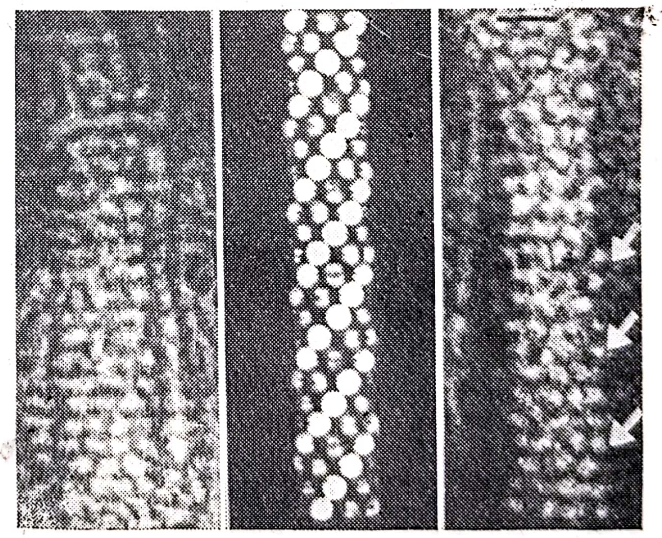


Fig. 69. Fagi din seria *T*-par ai *E. coli*. Se observă teaca cozii extinsă şi modelul ei de structură (după Bradley).

Între partea superioară a tecii şi capul fagului se interpune un *„guler"*, iar la extremitatea ei distală se găseşte *placa bazală.*

„Sîmburele" cozii sau cilindrul axial este, la rîndul său, o structură tubulară de natură proteică, de 70 Å Ø, corepunzînd canalului format de elementele tecii în care este inclus.

Gulerul fagului are forma unui disc subţire, hexagonal, cu diametrul mediu de 360 Å, situat între baza capului şi partea superioară a tecii. El are deci o simetrie radiară de tip 6, corespunzînd tipului general de simetrie al cozii. „Gulerul" este format din 6 subunităţi morfologice goale pe dinăuntru, situate cîte una la fiecare apex al hexagonului, şi dintr-un „dop" central de proteină. La nivelul lor s-ar face, după caz, fixarea sau liberarea capetelor terminale ale fibrelor cozii, în funcţie, probabil, de prezenţa unor factori necesari pentru adsorbţia pe o bacterie gazdă. În felul acesta „gulerul" ar juca un anumit rol în procesul de fixare al particulei fagice, deşi acest proces se petrece la distanţă de el.

Placa bazală are forma unui disc hexagonal cu diametrul mediu de 350 Å, avînd un orificiu central în care se fixeaxă puternic cilindrul axial

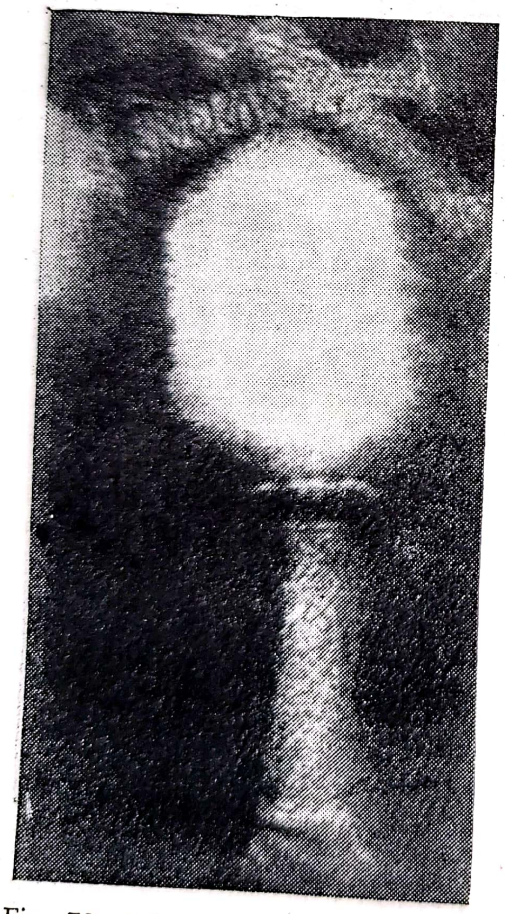


Fig. 70. Subunităţile de structură ale gulerului la fagul *Serratia marcescens* (după Bradley).

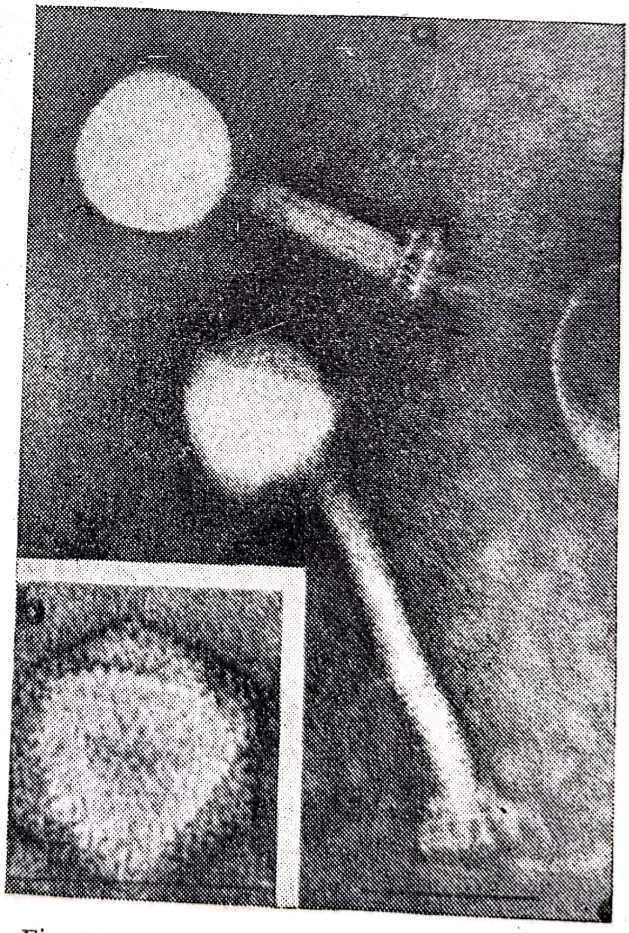


Fig. 71. Fag de *Bacillus subtilis*. Se observă forma (*a*) structura capului, (*b*), structura cozii şi a plăcii bazale precum şi croşetele plăcii (*c*) (după Eiserling).

(„sîmburele" cozii). Placa este prevăzută cu 6 croşete, vizibile atunci cînd placa este examinată din profil, dispuse cîte unul la fiecare apex. După Cota-Robles acestea ar fi unităţi integrale de fixare a fagului pe bacterie. După Bradley, placa bazală ar avea un rol foarte important în procesul de infecţie şi ar fi o structură puţin stabilă care, desprinsă de coadă, ar lua o formă de stea. Ca orice virus, fagul este lipsit de activitate metabolică, deci de enzime. La nivelul capătului distal al cozii — probabil făcînd parte din structura plăcii terminale — se găseşte însă o enzimă de tipul lizozimului, cu gr. mol. 15 000, activă asupra peretelui celular bacterian.

Fibrele cozii sînt structuri filamentoase proteice, lungi de 1 300 Å, Ø de 20 Å şi gr. mol. 400 000, alcătuite probabil din 4 subunităţi identice fixate, pe de o parte, pe placa bazală, iar pe de altă parte, prin extremitatea lor distală legată mai slab de subunităţile apicale ale gulerului. Astfel aranjate, ele formează structura numită de Daems (1961) *învelişul extern*, care reprezintă o reţea sau o „colivie" de fibre în jurul tecii cozii. În perioada premergătoare fixării pe o celulă bacteriană, fibrele se desprind de inserţia lor pe „guler" şi rămîn legate numai de placă, „înotînd" libere în mediu.

Genomul fagilor T_2, reprezentat de o moleculă de ADN dublu helical, cu gr. mol. de 120×10^6 — respectiv circa 200 000 perechi nucleotide (60% din greutatea virionului) — conţine în locul citozinei o bază neobişnuită -5-hidroximetilcitozina — care permite deosebirea lui de ADN bacterian. ADN fagic a

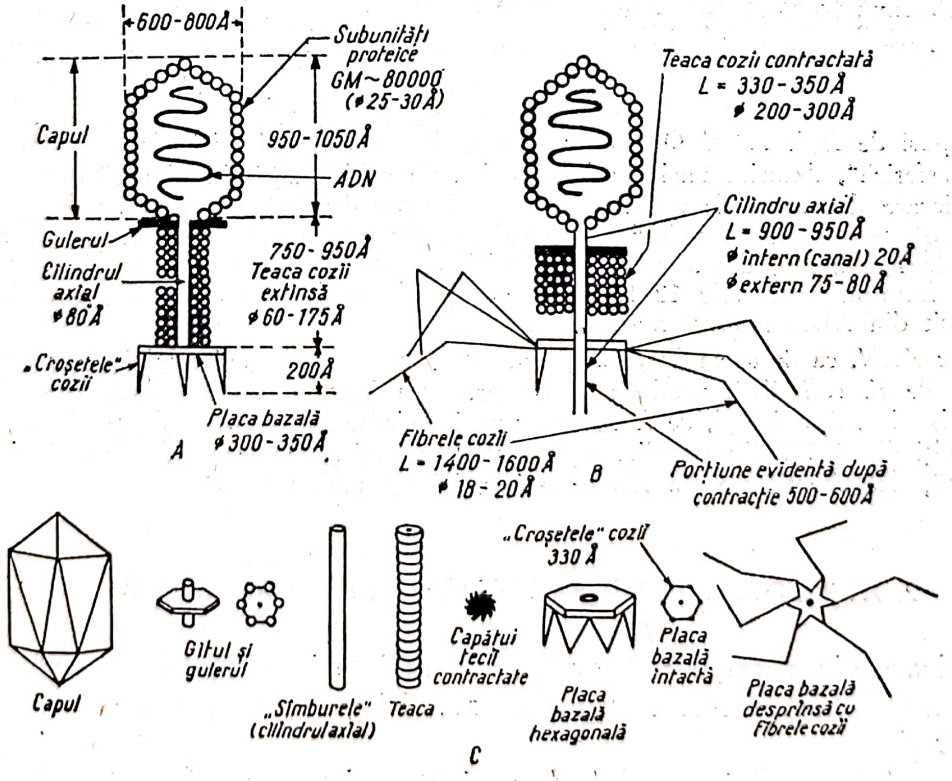


Fig. 72. Constituenţii fagilor din seria *T*-par şi dimensiunile lor medii. *A* — fag normal; *B* — fag prezentînd contracţia tecii cozii; *C* — diferiţi constituenţi ai particulei fagice.

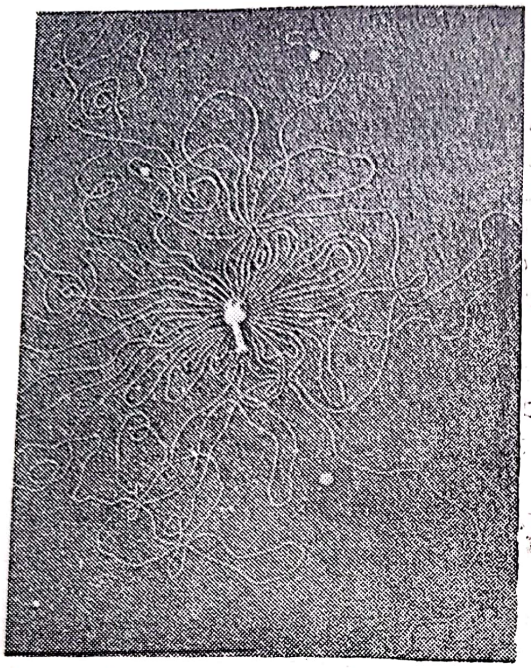


Fig. 73. Genomul fagului T_2: în centrul preparatului capsida proteică; molecula de ADN prezintă două extremităţi libere, probabil datorită ruperii ei în cursul preparării (după Kleinschmidt).

fost extras sub forma unei benzi liniare cu două capete libere, avînd o lungime medie de $49 \pm 4\ \mu$. Nu se cunoaşte configuraţia sa în virion. La unii fagi, molecula de ADN ar putea avea o orientare preferenţială în raport cu axul mare al capului. Pentru a fi aşezat în capul fagului *T*-par, ADN ar trebui să fie rulat în aproximativ 3—600 tururi de spiră. Experienţele de recombinare genetică pledează pentru o moleculă circulară, închisă, în care — după cum sugerează hărţile genetice întocmite pe baza lor — diferitele gene s-ar găsi într-o ordine continuă, în timp ce examenul autoradiografic a pus în evidenţă, după cum am arătat, o moleculă liniară, probabil datorită faptului că ADN se fragmentează uşor. Este posibil, de asemenea, ca în virionul fagic ADN să ia o configuraţie liniară, care să îngăduie injectarea lui în bacterii, deoarece diametrul intern al cilindrului axial prin care trebuie să treacă este numai cu puţin mai mare decîte diametrul dublei helice de ADN (25 Å).

Alte tipuri de fagi: *Fagul* $\Phi \times 174$ este unul dintre cele mai mici virusuri bacteriene. Are o formă „sferică", datorită unei capside cu simetrie cubică alcătuită din 12 capsomere aranjate pe fiecare din axele de ordinul *5* ale unui icozaedru. El este deci un *fag fără coadă*. Examenul electronooptic cu măriri puternice a arătat că, în realitate, fiecare capsomeră este alcătuită, la rîndul său, din 5 unităţi mai mici, aşezate nu pe cele 12 axe de simetrie, ci în jurul lor, formînd astfel cele 12 feţe pentagonale ale unui dodecaedru. Genomul acestui fag este alcătuit din ADN monocatenar.

Fagii cu ARN, ca de exemplu *fagul* f_2 sau MS_2, infectează numai tulpini cu caracter mascul (F^+, Hfr) de *E. coli K12*, producînd prin gruparea lor apariţia în celula infectată a unor incluzii cristaline. Aceşti fagi, de forma unor mici poliedre cu ϕ 200 Å şi gr. mol. $3 \times 3{,}5 \times 10^6$, sînt alcătuiţi din ARN dispus helical (gr. mol. $1{,}2 \times 10^6$) şi din circa 150 de molecule identice de proteină, alcătuite fiecare din 133 de aminoacizi (gr. mol. 15×10^3).

2. INFECŢIA CELULEI BACTERIENE. REPLICAREA FAGULUI

Ca oricare virus, fagul se înmulţeşte numai în interiorul bacteriilor vii şi în curs de multiplicare activă. Infecţia bacteriei-gazdă se produce în mai multe faze succesive:

1) *Adsorbţia fagului pe celula bacteriană.* Prima treaptă a procesului de infecţie este fixarea fagului la suprafaţa celulei-gazdă. Interacţiunea este specifică, întrucît un anumit fag se adsoarbe numai pe anumite tulpini bacteriene

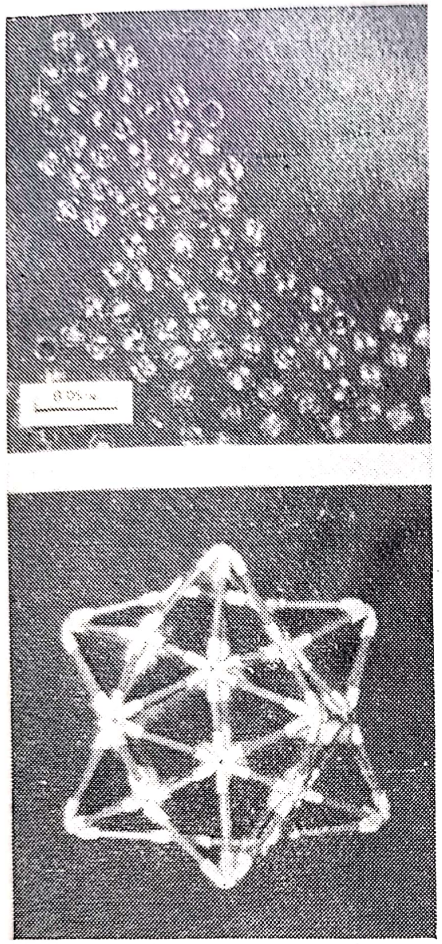


Fig. 74. Morfologia fagului Φ ×174: aranjarea capsomerelor pe suprafaţa virionului (*sus*); model de structură a fagului (*jos*) (după Finch).

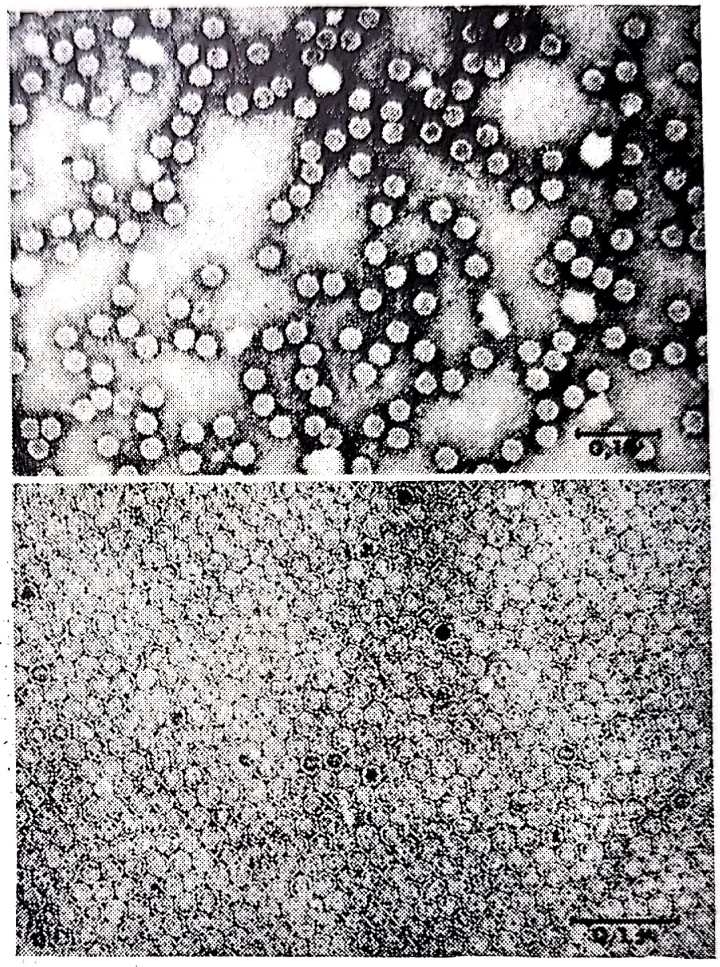


Fig. 75. Structura fagilor cu ARN activi pe *E. coli*: *sus* — învelişuri proteice cu profiluri sferice, golite de conţinut; *jos* — aranjare „cristalină" bidimensională de particule virale (după Vasquez).

şi este condiţionată de faptul că fagul are dispozitive foarte eficiente de fixare, iar celula-gazdă are zone specifice, net localizate, constituind receptori care permit fixarea virusului. Această interacţiune, încă neclarificată, depinde probabil de configuraţia unor suprafeţe chimice combinante specifice ale fagului şi ale pere-

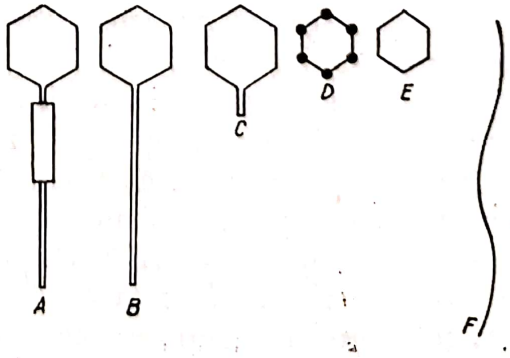


Fig. 76. Principalele tipuri morfologice de fagi:

A — fagi cu coada contractilă; *B* — fag cu coadă lungă necontractilă; *C* — fag cu coadă scurtă necontractilă; *D* — fag fără coadă, cu capsomere mari; *E* — fag fără coadă cu capsomere mici; *F* — fag filamentos, flexibil fără cap; *A*—*C*: fagi cu ADN dublu helical *D* şi *F*: fagi ADN monocatenar; *E*: fagi ARN.

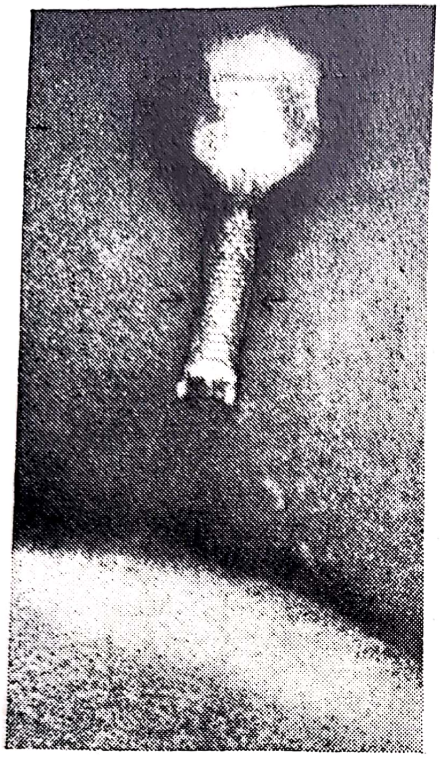


Fig. 77. Faza iniţială de adsorbţie a fagului T_2 pe bacteria *E. coli:* două din fibrele cozii aderă de peretele bacterian; celelalte (indicate de săgeţi) sînt retractate paralel cu teaca cozii (după Höglund).

telui celular bacterian. Receptorii de fag ai bacteriei sînt localizaţi în stratul lipidic extern al peretelui celular.

După o serie de ciocniri întîmplătoare, fagul revine în contact cu bacteria — prin intermediul fibrelor cozii — în faza de fixare iniţială. Această fază este reversibilă şi relativ lipsită de specificitate, dar pregăteşte faza specifică de fixare realizată de extremitatea cozii prin intermediul plăcii hexagonale care amorsează mecanismele de injectare a ADN.

După Cota-Robles (1963), la fagul T_2 un rol esenţial în fixare l-ar juca „croşetele" plăcii bazale, întrucît distanţa dintre placă şi peretele celular nu este niciodată mai mică de 50 Å.

În sfîrşit, fagii sferici fără coadă şi fagii filamentoşi se fixează specific pe apendicele celulei bacteriene. Unii dintre aceşti fagi se adsorb *pe flageli*, alunecînd de-a lungul lor pînă la suprafaţa bacteriei (Meynell 1965). Alţii se fixează pe pili, şi anume *fagii „masculi"* cu ARN ai *E. coli* se adsorb pe laturile pililor *F* ai acestor celule (Zinder 1965), iar *fagii filamentoşi* pe extremitatea pililor *F*.

2) *Injectarea genomului viral în celula bacteriană.* Capsida fagului are rolul de a proteja ADN şi de a-l introduce în celula bacteriană. Exceptînd unii dintre constituenţii ei minori, care pătrund în bacterie o dată cu ADN, capsida, ca formaţie structurală, rămîne în întregime la exterior. În urma fixării, legăturile thiolester ale fibrelor cozii sînt oxidate de Zn^{++} din peretele celular, după care ar urma o demascare a „lizozimului" fagic, care în realitate este o enzimă similară lizozimului — *muramidaza* — acţionînd prin lezarea peretelui celular în vecinătatea suprafeţei de adsorbţie a particulei fagice.

Contracţia tecii, amorsată de liberarea legăturilor *-SH* survenită în faza anterioară, forţează probabil „sîmburele" să pătrundă prin leziunea peretelui celular şi, în final, ADN din „capul" fagului trece în celulă pe calea „sîmburelui" tubular. După unii autori, cilindrul axial ar fi mai curînd un „dop", pe care contracţia tecii l-ar libera, trecerea ADN făcîndu-se direct prin teacă. În această fază, pe lîngă ADN trec în celulă şi mici cantităţi de proteine, oligopeptide bazice şi poliamine, reprezentînd probabil fragmente de proteine fagice legate ionic de ADN. În ansamblu, virionul fagic poate fi asemănat cu o microseringă adaptată ca după fixarea pe celula bacteriană să-şi inoculeze conţinutul în interiorul acesteia.

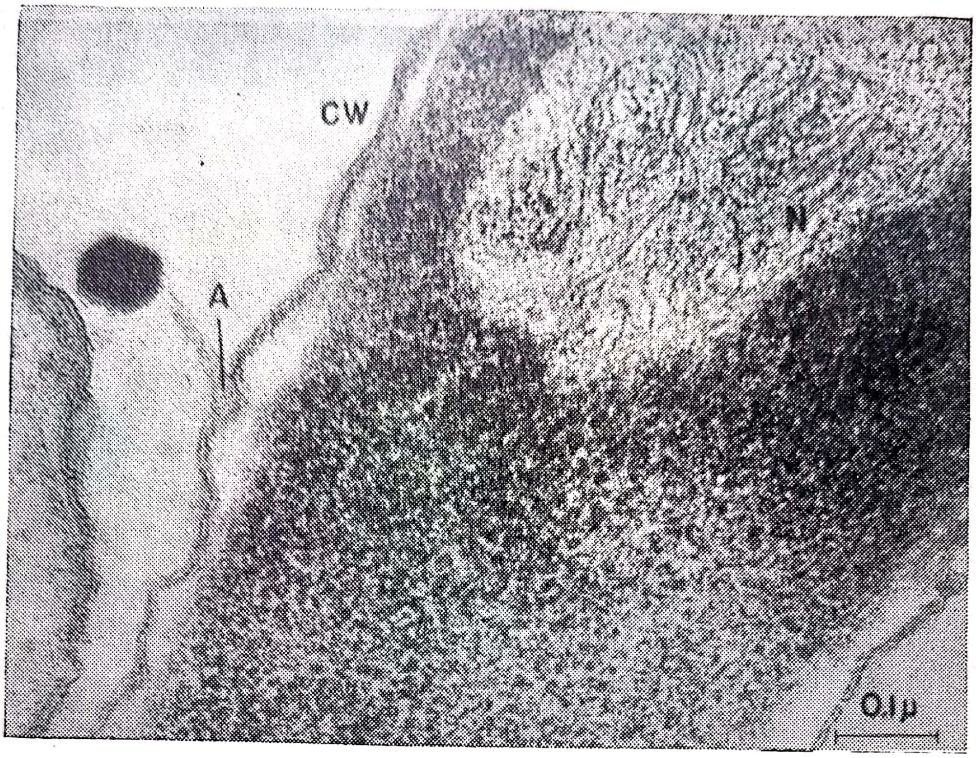


Fig. 78. Secţiune printr-o celulă de *E. coli* evidenţiind un fag T_2 intact fixat de peretele celular. Se observă structura modificată a zonei de fixare a virusului (*A*), nucleul (*N*) şi peretele celulei (*CW*) (după Cota-Robles).

Ca mecanism, contracţia cozii are particularităţi similare acelora ale contracţiei musculare. Coada fagului T_2 conţine aproximativ 1 000 de molecule ATP (cu rol în contracţia tecii) şi aproximativ 100 de ioni de calciu.

Injectarea ADN este declanşată probabil de glucozaminele rezultate din hidroliza mucopolizaharidelor peretelui celular.

3) *Procesele intracelulare induse de prezenţa genomului fagic. Fagul vegetativ.* După pătrunderea ADN fagic în celulă, activitatea de biosinteză a bacteriei trece sub control viral, deoarece prin genomul său virusul introduce un plan nou de sinteză pe care celula îl preia, producînd constituienţi virali în locul constituenţilor proprii. Procesul se desfăşoară în mai multe etape.

Imediat după injectarea ADN fagic, sinteza de acizi nucleici bacterieni (ADN şi diferite tipuri de ARN), ca şi aceea a proteinelor proprii încetează, dar celula bacteriană continuă să sintetizeze aminoacizi şi baze nucleice. În acelaşi timp, sub acţiunea unor mecanisme, după cît se pare mai complexe, fagul intră în aşa-numită „fază de eclipsă", în care se produce blocarea exprimării funcţionale a ADN bacterian şi chiar dezintegrarea lui prin depolimerizare pînă la mononucleotide, probabil sub acţiunea unei enzime (dezoxiribonucleaza) preexistente în stare blocată în bacterie.

Chiar din primele minute ale infecţiei (între 4—15′) apar în celulă proteine noi, specifice virusului, aşa-numitele *proteine precoce*, care îndeplinesc trei funcţii importante: *a)* blochează activităţile celulei-gazdă şi, în primul rînd,

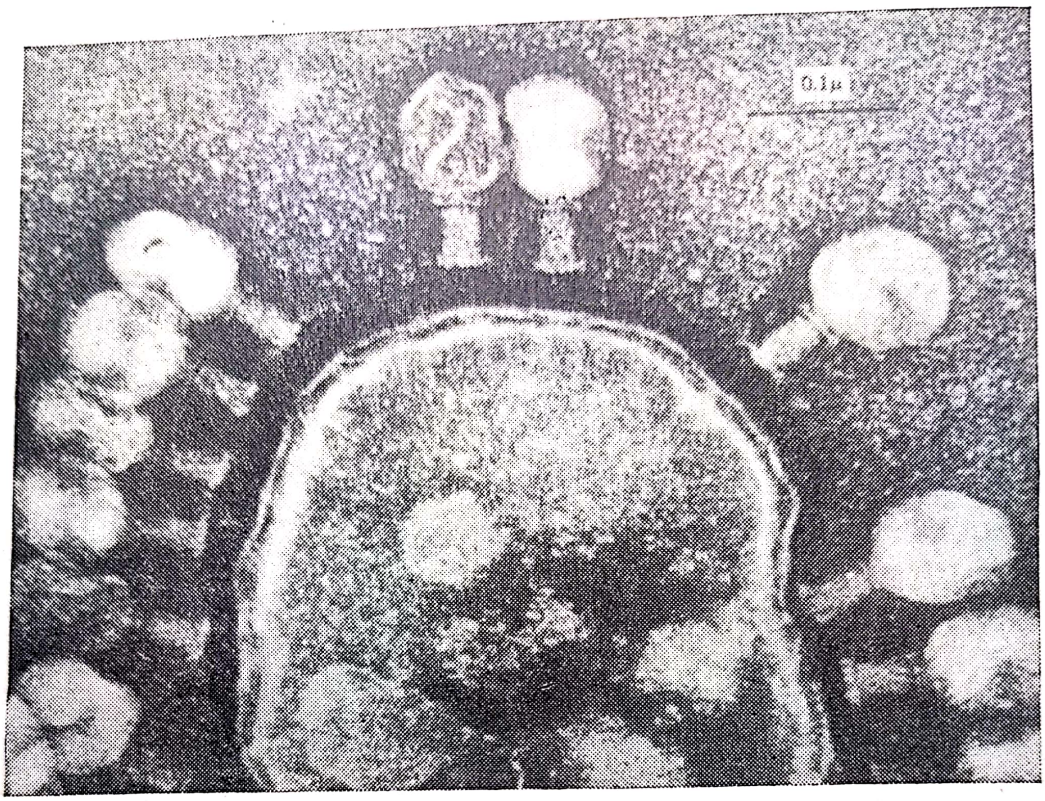


Fig. 79. Celulă de *E. coli* parţial lizată pe suprafaţa căreia s-au fixat mai mulţi fagi T_4. Distanţa dintre placa bazală a fagului şi peretele celular sugerează că fixarea acesteia pe bacterie se face prin intermediul croşetelor plăcii (după Simon).

Fig. 80. Fag filamentos *E. coli* f_1 adsorbit pe pili-F marcaţi cu fagi ARN lipsiţi de coadă (după Caro).

Scanned with OKEN Scanner

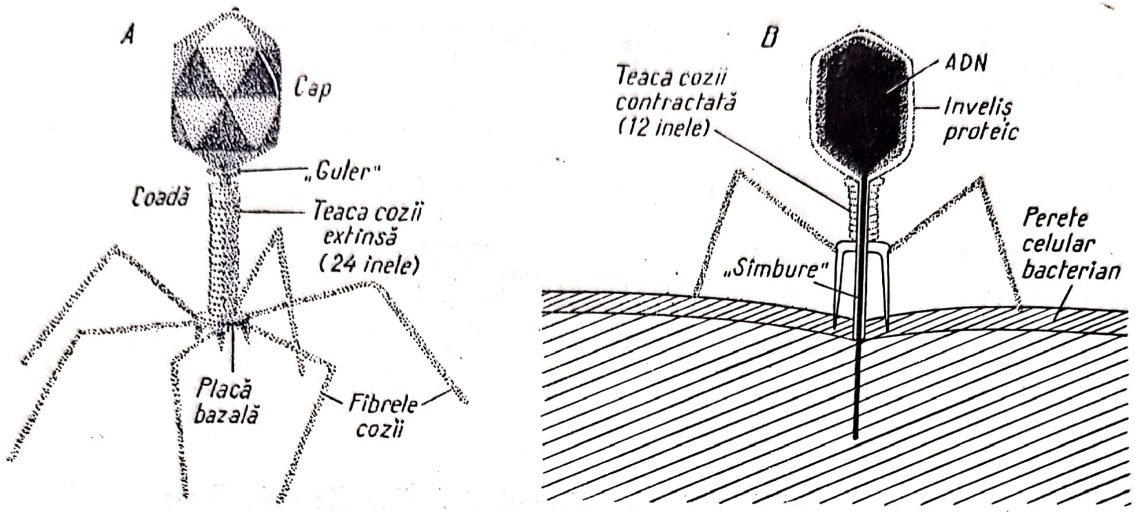


Fig. 81. Reprezentare schematică a unui fag din seria *T*-par în stare normală (*A*) şi în momentul infectării (*B*) unei celule bacteriene (după Wood).

sinteza de ADN propriu; b) participă la sinteza unor componenţi virali noi, precursori ai ADN fagic (cum este hidroximetilcitozina, care nu există în mod normal în celula bacteriană); *c)* reglează activităţile noi ale celulei-gazdă, permiţînd într-o primă fază sinteza proteinelor enzimatice şi blocînd sinteza celor structurale, pentru ca apoi, după circa 15′ de la infecţie, să stopeze sinteza enzimelor şi să declanşeze sinteza proteinelor structurale. De asemenea, aceste proteine reglează rata de sinteză a diferitelor tipuri de proteine structurale fagice, întrucît numărul subunităţilor proteice în diferiţii componenţi structurali ai fagului este foarte diferit (membrana capului este compusă din aproximativ 1 000 de subunităţi, iar cele 6 fibre ale teciei din mai puţin de 30); este de aceea necesar ca producerea diferitelor tipuri de proteine să fie făcută cît mai adecvat nevoilor, pentru a se asigura încorporarea lor eficientă în

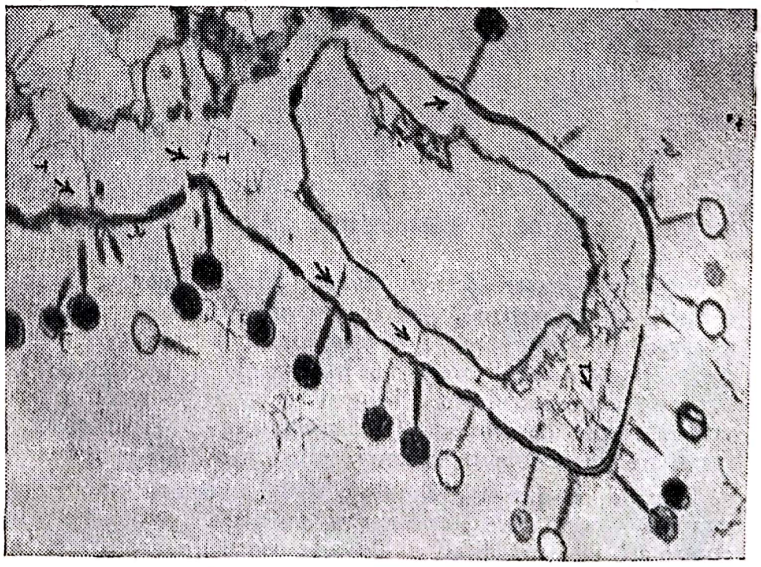


Fig. 82. Secţiune printr-un perete celular bacterian golit de conţinutul celular. În unele regiuni (marcate cu săgeţi) cilindrul axial a perforat peretele celular şi este vizibil în interiorul bacteriei. Filamentele (*T*) reprezintă probabil ADN fagic (după Milne).

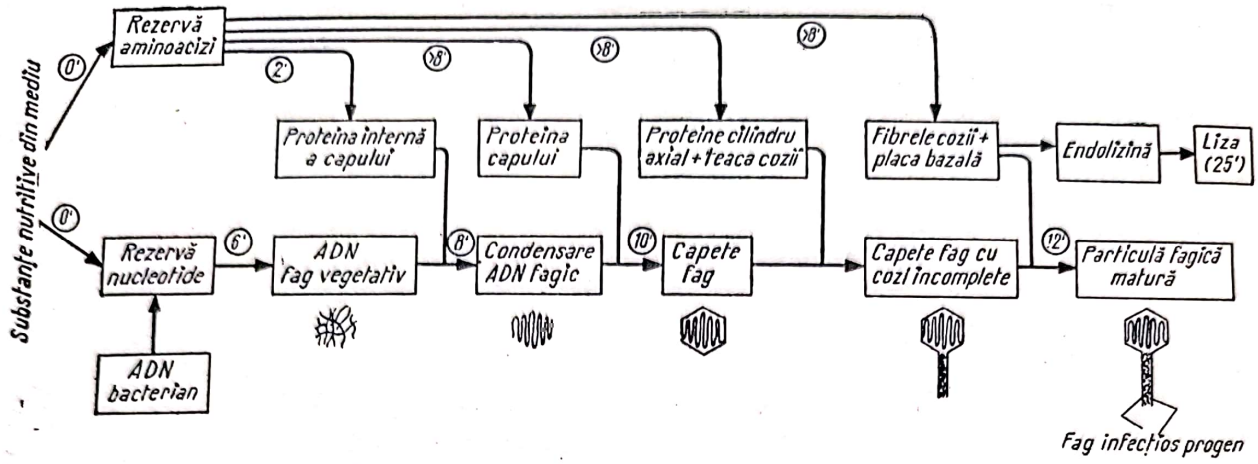


Fig. 83. Dinamica biosintezei diferiţilor constituenţi ai fagilor din seria *T*-par după infectarea bacteriei *E. coli*. Desenul indică timpul în minute din momentul producerii infecţiei (după Stent).

particule virale complete. După acumularea enzimelor, la 7′—15′ de la infecţie începe sinteza de ADN fagic nou, iar după 15′ se formează proteinele de structură aparţinînd capului, cozii şi fibrelor fagului.

4) *Maturarea fagului şi morfogeneza.* „Asamblarea" celei dintîi particule de fag se produce la puţin timp după apariţia primelor proteine structurale. Cu puţin înainte de sfîrşitul fazei de eclipsă, ADN fagic — care pînă atunci era distribuit difuz în celulă — începe să se condenseze în „pachete" de mărimea şi forma capetelor de fag. În prima fază a formării lor, aceste „pachete" de ADN nu sînt înconjurate de o membrană proteică vizibilă, ceea ce sugerează că ADN se condensează independent de „asamblarea" proteinelor de structură ale capului, care s-ar depune ulterior în jurul lui. Urmează apoi „asamblarea" celorlalte structuri. Condensarea subunităţilor de construcţie ale „sîmburelui" cozii (cilindrul axial) s-ar face în jurul unui capăt rămas liber (necondensat) al moleculei de ADN fagic. Lungimea acestui capăt liber al moleculei de ADN ar determina lungimea „sîmburelui", care, la rîndul ei, ar condiţiona lungimea tecii cozii. Astfel, după unii autori, în momentul formării sale, fagul matur are deja o parte din molecula sa de ADN angajată în canalul prin care, va fi „injectată". Complexitatea procesului de maturare a fagului sugerează că el nu ar evolua cu totul spontan, aşa cum se face cristalizarea, ci ar necesita eventual intervenţia unor enzime de asamblare.

Probleme legate de construcţia bacteriofagului. Problema construcţiei bacteriofagului este deosebit de interesantă, deoarece permite înţelegerea modului în care informaţia genetică poate interveni în asamblarea a diverse tipuri de molecule pentru formarea unor structuri mai complexe. Bacteriofagul oferă un bun model experimental în această privinţă, deoarece genomul său este depozitarul unei informaţii genetice mult mai bogate comparativ cu aceea a altor virusuri: spre deosebire, de exemplu, de VMT, al cărui ARN este echivalentul a 5—6 gene, fagul are un genom reprezentat prin circa 100 de gene.

Lucrînd cu mutante ale fagului T_4, obţinute în laborator, Wood şi Edgar au demonstrat că virusul este sintetizat şi construit „pe bucăţi", fiecare adiţie de constituenţi noi fiind controlată de gene diferite. Dovada constă în faptul că, la fagii respectivi, fiecare genă mutantă

formează în locul unei proteine normale o proteină alterată, nefuncţională şi, ca urmare, dezvoltarea virusului stopează în punctul unde este necesară proteina respectivă. Prin acest mecanism — utilizîndu-se diferite mutante — se poate stabili poziţia genelor pe harta cromozomului respectiv şi se poate demonstra acţiunea lor în dezvoltarea virusului. Observîndu-se la microscopul electronic ce structuri ale fagului lipsesc ca rezultat al mutaţiei unei anumite gene, se poate deduce funcţia morfogenetică normală a genei respective. Acest lucru este posibil întrucît blocarea formării uneia dintre structuri nu afectează asamblarea celorlalţi constituenţi care se acumulează în celulă sub forma lor normală şi completă. Pentru a descifra modul în care se face sinteza diferiţilor constituenţi, rolul fiecărei gene, modul de asamblare a diferitelor structuri libere într-un virus infecţios şi succesiunea diferitelor trepte în asamblarea acestuia, Wood şi Edgar au folosit diferite extracte ale unor celule bacteriene în care s-au multiplicat fagi defectivi. Defectul genetic consta, spre exemplu, în aceea că în loc de virus complet se formau numai una, două sau trei structuri din componenţa sa: de exemplu, numai capul fagic (nu şi cozile şi fibrele), sau numai fibrele (fără cozi şi capete) etc. Amestecînd *in vitro* extracte de acest fel în diferite combinaţii, ei au reuşit să reconstituie fagul T_4 activ pornind de la constituenţii săi. Spre exemplu, amestecînd două extracte, unul conţinînd cozi şi fibre libere (fără capete) şi un altul numai capete şi fibre libere (fără cozi), aceşti cercetători au obţinut virus infecţios ca rezultat a două reacţii succesive: una de fixare a cozilor la capete şi alta de fixare a fibrelor la particulele cu coadă rezultate.

În concluzie, cercetările lui Wood şi Edgar arată că fagul nu este construit printr-un proces care începe de la un capăt şi continuă, prin adăugarea secvenţială de subunităţi, pînă ce se ajunge la capătul celălalt (aşa cum se croşetează un ciorap), ci se constituie din porţiuni separate, pe trei linii principale de „asamblare", care duc independent la formarea capului, a cozii şi a fibrelor cozii. În treptele următoare, compuşii finiţi care au rezultat se combină pentru a

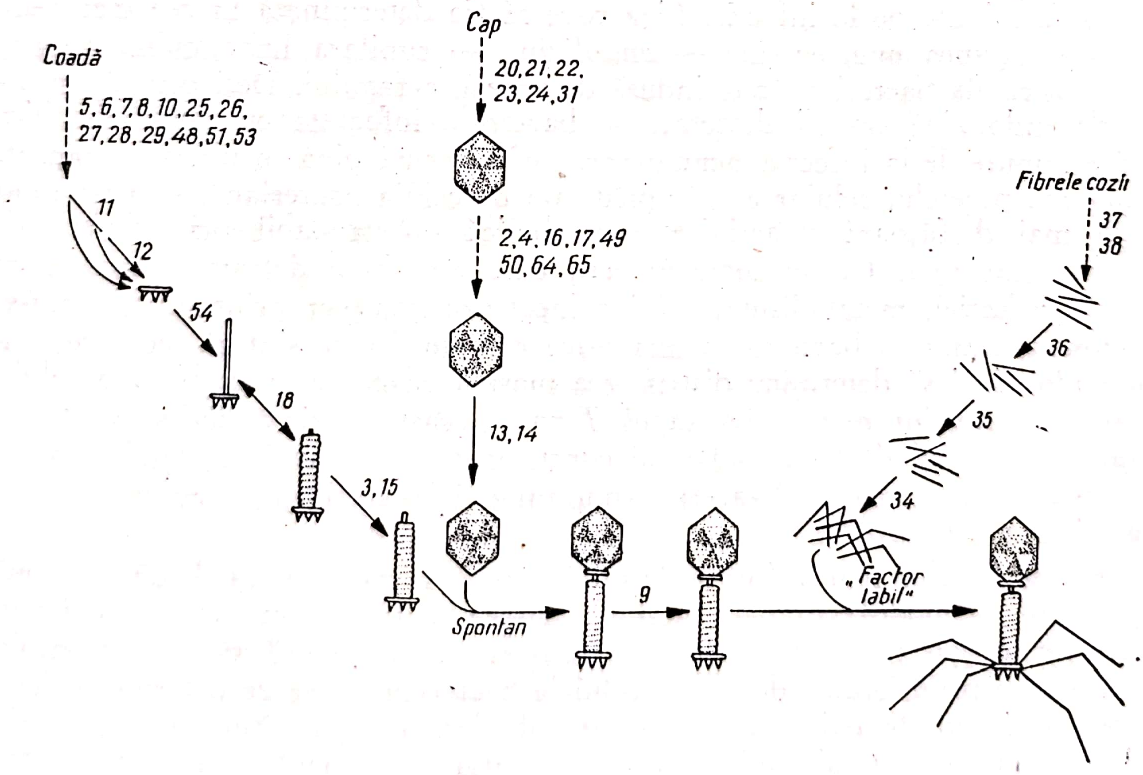


Fig. 84. Etapele procesului de morfogeneză a fagului T_2. Procesul evoluează în trei direcţii, ducînd respectiv la formarea de capete, cozi şi fibre de cozi, care apoi se asamblează pentru a constitui particule virale complete. Săgeţile continue indică etape a căror realitate a fost demonstrată experimental. Cifrele desemnează genele implicate în etapa respectivă.

forma particula virală. Aceşti cercetători au identificat pînă în prezent 45 de gene care controlează procese morfogenetice. Unele gene dirijează procesul de asamblare fără a avea vreun rol în sinteza materialului viral de construcţie. Procesul se desfăşoară în etape succesive. Primele stadii ale morfogenezei capsidei sînt controlate de 6 gene. Rezultă un „precursor" al capului, vizibil la microscopul electronic, dar incapabil de combinare cu coada. Sub acţiunea altor 8 gene, el se transformă în cap „activ", la care genele 13 şi 14 determină formarea părţii superioare a gîtului şi gulerului. Placa terminală e produsă cu participarea a 15 gene, iar cilindrul axial cu a altor două. Trei gene dirijează formarea tecii cozii. Capetele complete şi cozile se unesc spontan, pentru a forma o particulă precursor apoi, sub acţiunea produsului genei nr. 9, ia naştere o particulă formată din cap şi coadă. Final, fibrele cozii formate sub influenţa produselor (enzimelor) a 5 gene se fixează pe particula de fag care — cu excepţia lor — era completă. Nu se cunoaşte modul în care produşii corespunzători genelor participă la construcţia diferitelor structuri şi nici calea pe care genele controlează formarea diferitelor structuri biologice.

După unii autori, construcţia unei structuri aşa de complicate cum este capul fagului (un icozaedru alungit) este greu de realizat prin autoasamblare şi s-ar face pornind de la un sîmbure morfopoietic (un corp geometric construit iniţial, format dintr-un număr minim de subunităţi), pe care subunităţile capsidei s-ar dispune în poziţiile corespunzătoare, înainte de a se lega între ele. După ce capsida a fost asamblată, acest sîmbure ar putea să dispară, aşa cum în arhitectură — după construirea unei arcade — se înlătură cofrajul care dădea forma şi susţinea piesele componente pînă la punerea „cheii de boltă", care încheie construcţia şi-i asigură stabilitatea.

5. *Liza bacteriei şi liberarea fagului.* Multiplicarea fagului se încheie brusc prin liza celulei bacteriene şi liberarea conţinutului ei în virioni după circa 20—25 de minute de la infecţie. Liza pare să fie determinată în cea mai mare parte de acţiunea unei enzime — *endolizina* — similară lizozimului, a cărei sinteză în celula bacteriană este indusă de prezenţa fagului. Deşi primele molecule de endolizină pot fi detectate în bacteriile infectate cu fagul T_4 chiar după 8 minute de la infecţie, acumularea lor continuă pînă în ultimul moment. Dizolvarea peretelui celular este împiedicată de celula bacteriană — atîta timp cît ea mai desfăşoară o activitate metabolică — probabil prin sinteza de perete celular nou. La un moment dat, care este bine definit în raport cu iniţierea infecţiei, metabolismul celular încetează complet printr-un mecanism necunoscut, astfel că bacteria nu mai face nici un fel de sinteză, ceea ce permite endolizinei să determine distrugerea masivă cu caracter exploziv a celulei şi liberarea fagului matur. La fagul *T*-par, această enzimă acţionează ca o *muramidază,* catalizînd clivajul unui constituent al peretelui celular la nivelul unei legături între acidul *N*-acetil-*L*-muramic şi *N*-acetil-glucozamină (K a t z şi W e i d e l, 1965).

Prezenţa fagului matur într-un produs poate fi pusă în evidenţă pe două căi, bazate pe modul său de a acţiona asupra culturii bacteriene sensibile în mediu lichid sau pe mediu solid: *1)* adăugat la o cultură tînără, în mediu lichid, el are proprietatea de a liza celulele bacteriene, ceea ce determină clarificarea mediului de cultură; *2)* aplicat sub formă de picături din suspensia fagică la suprafaţa unui mediu solid însămînţat „în pînză" cu o cultură bacteriană tînără, el determină formarea în pînza de cultură a unor zone clare, lipsite de creştere bacteriană, *plajele de liză.* Acestea reprezintă mici suprafeţe circumscrise în care cultura a fost „mîncată" şi pot fi produse chiar de depunerea unei singure particule de fag. La nivelul lor sînt acumulate în urma

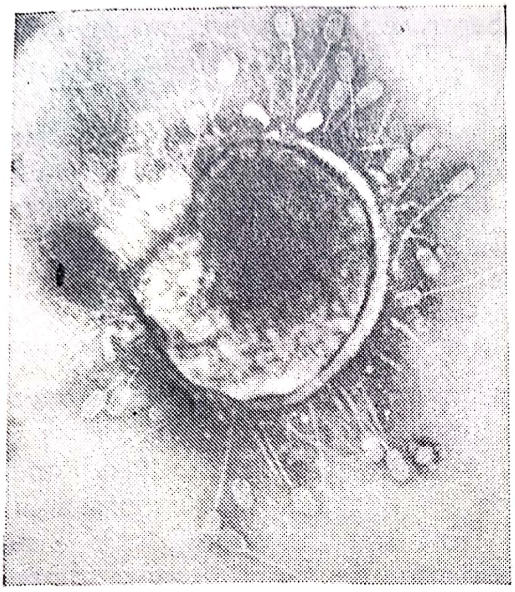


Fig. 85. Celulă de *Staphylococcus aureus* pe cale de a fi lizată de fag (microelectronografie din colecţia Royal Microscopical Society).

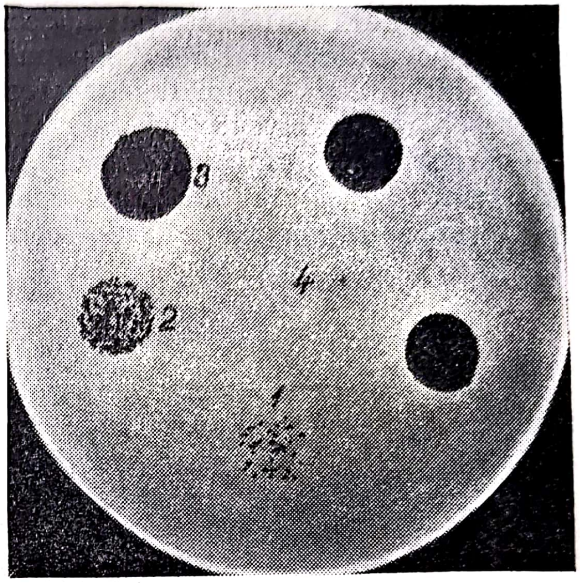


Fig. 86. Evidenţierea fenomenului de bacteriofagie pe o cultură bacteriană pe agar: *1* — plaje de liză; *2* — liză semiconfluentă; *3* — liză confluentă; *4* — cultură normală.

lizei milioane de particule fagice, adevărate colonii de virus. Numărul plajelor formate pe suprafaţa unui mediu dă indicaţii asupra bogăţiei produsului respectiv în fagi. Cînd plajele sînt foarte numeroase şi apropiate între ele sau foarte mari, ele se ating şi se unesc dînd aspectul de liză confluentă.

3. RELAŢII ECOLOGICE ÎNTRE FAG ŞI BACTERIA SA GAZDĂ

Relaţiile fago-bacteriene sînt în primul rînd caracterizate prin specificitatea lor: un anume fag nu poate infecta orice tulpină sau specie bacteriană, ci numai pe acelea care alcătuiesc spectrul său de activitate în sensul că sînt sensibile la acţiunea lui, iar celulele unei tulpini sau specii bacteriene nu sînt sensibile decît faţă de anumiţi bacteriofagi.

În funcţie de modul lor de acţiune asupra bacteriei-gazdă, fagii sînt de două tipuri: *a) fagi virulenţi* sau *litici*, care determină infecţia litică productivă a bacteriei-gazdă şi *b) fagi temperaţi* sau *simbiotici*, care produc foarte rar infecţia litică deoarece, în mod obişnuit, rămîn în celulă în stare latentă ca profag, fag endogen sau fag de lizogenie, transmisibil în serie la fiecare diviziune celulară întocmai ca un constituent bacterian normal, fără lizarea celulei.

După răspunsul lor posibil faţă de o infecţie fagică, bacteriile se împart, la rîndul lor, în trei categorii: *1) bacterii receptive* sau *lizosensibile* — caracterizate prin capacitatea lor de a permite adsorbţia, infecţia şi multiplicarea unui anumit fag virulent, urmată de liză; *2) bacterii lizogene* — capabile de a suporta infecţia latentă cu un fag temperat, pe care-l transmit ereditar la

descendenţi fără a fi lizate de el, deci fără liberare de fag matur, cu excepţia unui număr infim de celule din populaţia totală; 3) *bacterii lizorezistente* care nu permit infecţia cu un fag deoarece: *a)* nu sînt receptive faţă de el (fiind lipsite de receptorii specifici care să permită adsorbţia lui); *b)* sînt capabile să-l neutralizeze (împiedicînd multiplicarea lui în celulă); *c)* sînt imune faţă de el (întrucît poartă deja fagul omolog sub formă de profag, cu care celula se află într-o relaţie caracteristică stării de lizogenie).

Lizogenia

Infecţia unei celule bacteriene cu un fag temperat poate evolua fie în sensul trecerii fagului în stare vegetativă urmată de sinteza a noi particule fagice şi de liza celulei, fie în sensul menţinerii lui în stare de profag, în cadrul unei relaţii compatibile cu viaţa celulei bacteriene — corespunzînd fenomenului de lizogenie. Direcţia de evoluţie a infecţiei (liză sau lizogenie) depinde de constituţia genetică a fagului temperat — respectiv de funcţia unora dintre genele sale — iar pentru un acelaşi fag dat, de starea fiziologică a bacteriei, care poate fi modificată sub acţiunea unor condiţii de mediu. Astfel, proporţia bacteriilor care pot deveni lizogene variază între 1 şi 99%. Temperaturile ridicate (40°) favorizează ciclul litic, iar cele scăzute (20°) starea de lizogenie.

Descoperită de Bordet şi Ciucă în 1920, lizogenia poate fi definită ca un fenomen legat de infectarea unei bacterii cu un fag temperat, fenomen caracterizat prin faptul că uneori fagul infectant nu iniţiază faza sa vegetativă de multiplicare. Ca urmare, bacteria lizogenă supravieţuieşte, creşte şi se multiplică normal, transmiţînd însă indefinit la descendenţi potenţialitatea de a produce în anumite condiţii particule fagice, în absenţa unei infecţii exogene cu fagul omolog. Într-adevăr, numai periodic şi cu o frecvenţă foarte joasă, fagul din unele celule ale unei populaţii bacteriene lizogene poate trece în faza vegetativă, ceea ce duce la liza celulei-gazdă în urma multiplicării fagice masive (de aici termenul de *lizogen* = care poate genera liză). Acest mecanism asigură de altfel menţinerea şi răspîndirea fagului temperat în natură.

O asemenea comportare se datoreşte faptului că fagul temperat din celula lizogenă nu distruge genomul celular, deoarece el se află într-o relaţie de echilibru stabil cu gazda sa bacteriană, atîta timp cît materialul lui genetic se menţine sub forma unei structuri specifice neinfecţioase numite *profag*. Cercetările experimentale au demonstrat că profagul are următoarele proprietăţi: *a)* poartă informaţia genetică răspunzătoare de sinteza întregii particule virale — dovadă faptul că în rarele cazuri în care devine „activ" (trecînd în faza vegetativă) el este capabil să inducă formarea de virion complet; *b)* este integrat la nivelul unui anumit locus în cromozomul celulei-gazdă; *c)* integrat în cromozomul bacterian el se replică numai o dată cu acesta, adică la 20—50 de minute, în funcţie de specia bacteriană, spre deosebire de fagul vegetativ care, aflat în stare autonomă în citoplasmă, se replică la fiecare 2—3′; *d)* prezenţa şi potenţialităţile sale ca virus nu se manifestă ca atare în celula bacteriană lizogenă, care nu conţine nici proteine fagice şi nici virioni, dar, datorită lui, aceasta dobîndeşte unele proprietăţi noi. Cu alte cuvinte, profagul integrat se

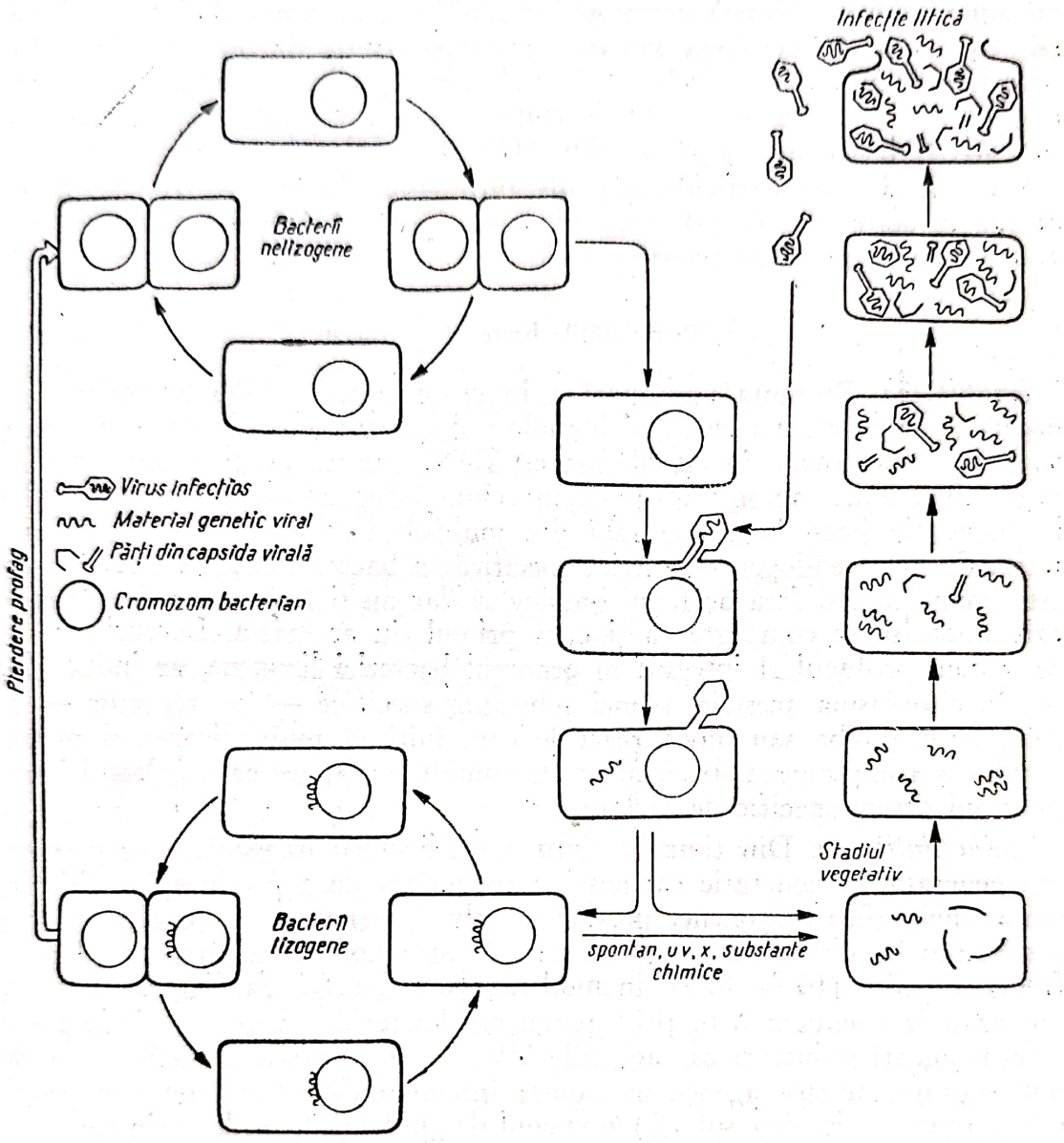


Fig. 87. Ciclul de evoluţie al fagului temperat în celula bacteriană. Infecţia unei celule normale poate evolua fie spre liză cu eliberare de fag matur, fie spre starea de lizogenie (fag temperat) prin integrarea cromozomică a genomului fagic, ca profag. Spontan sau indus (U.V., X etc.), profagul poate trece în stare de fag vegetativ care provoacă liza celulară. În cursul diviziunilor celulare, profagul poate fi pierdut, în care caz celula redevine normală.

comportă în general ca un fragment de material genetic exogen, supraadăugat genomului normal al celulei-gazdă.

Integrarea profagului în cromozomul bacterian la nivelul unui locus specific al acestuia este consecinţa unei corespondenţe de structură între doi acizi nucleici aflaţi la un moment dat în interacţiune: unul viral, *profagul*, şi altul bacterian, *cromozomul*, şi anume o porţiune a acestuia din urmă reprezentînd

un anumit locus. Această corespondenţă reflectă o compatibilitate moleculară, adică o anumită homologie sau o complementaritate din punctul de vedere al succesiunii bazelor între cele două molecule de acid nucleic. Într-adevăr, s-a demonstrat experimental că fagii temperaţi au o compoziţie în baze a ADN similară aceleia a unei porţiuni din ADN aparţinînd bacteriei-gazdă.

Datorită acestor particularităţi ale profagului, bacteriile lizogene îl poartă ca fag în stare latentă şi-l transmit astfel indefinit la descendenţi, ca şi cum ar fi un constituent bacterian normal.

Proprietăţile bacteriilor lizogene

Imunitatea. Prezenţa unui profag în cromozomul celulei bacteriene o face imună la suprainfecţia cu fagul homolog. Acesta se adsoarbe la suprafaţa celulei şi îşi „injectează" în citoplasma ei ADN, dar nu poate evolua spre starea vegetativă, adică nu se multiplică în celula infectată şi, ca atare, se diluează în populaţia bacteriană rezultată din multiplicarea acesteia. Imunitatea conferită de fagul endogen este strict specifică: o bacterie care poartă profagul *A* este imună numai faţă de fagul omolog *A* dar nu şi faţă de un fag eterolog *B*, care poate să se comporte ca şi cum primul nu ar exista. Lucrurile se petrec ca şi cum profagul *A* integrat în genomul bacteriei lizogene, ar induce formarea în citoplasma acesteia a unei substanţe specifice — un represor — avînd rolul de a inhiba sau bloca reacţiile care iniţiază multiplicarea şi maturarea fagului omolog exogen. În felul acesta imunitatea apare ca rezultatul intervenţiei unui sistem specific de reglare.

Inductibilitatea. Din timp în timp unele bacterii lizogene, care perpetuează din generaţie în generaţie capacitatea potenţială de a produce fag litic în absenţa unei infecţii exogene, produc efectiv fag matur, ca rezultat al trecerii profagului în starea de fag vegetativ. Acest fenomen se poate produce, cu o frecvenţă mică (10^{-2}—10^{-7}), în mod „spontan", adică fără o cauză cunoscută sau cu o frecvenţă mărită prin expunerea bacteriilor lizogene „inductibile" la diferiţi agenţi inductori ca radiaţiile UV, sau X, peroxizii, iperita azotată etc. Sub acţiunea acestor agenţi, un număr însemnat de celule bacteriene mor, dar cele care supravieţuiesc suferă fenomenul de „inducţie", tradus prin trecerea profagului lor în starea de fag litic. În felul acesta, după aproximativ o oră, fiecare bacterie lizogenă „indusă" liberează circa 100 de corpusculi fagici maturi.

Se admite că agenţii inductori, cunoscuţi şi ca agenţi mutageni, ar acţiona blocînd sau suprimînd sinteza substanţei-represor, care împiedică multiplicarea fagului, respectiv trecerea lui în stare vegetativă. Cînd această substanţă nu mai este sintetizată, concentraţia sa în citoplasmă scade, astfel că profagul, scăpat de sub acţiunea ei represoare, poate trece în faza vegetativă, care se încheie cu eliberarea particulelor fagice prin liza celulară.

Starea de lizogenie diferă fundamental de infecţia litică. În timp ce la bacteriile infectate cu un fag virulent întregul mecanism director al metabolismului bacteriei-gazdă este dirijat în sensul sintezei de material fagic, la bacteriile lizogene genomul viral se substituie unei porţiuni a cromozomului bacterian, astfel încît celula-gazdă se dezvoltă normal, numai că de fiecare dată —

sincron cu propriul ei genom — se replică şi genomul viral, adică profagul integrat în cromozom. Prezenţa profagului, deşi latentă comparativ cu manifestarea explozivă a fagului virulent, se însoţeşte însă de modificări ale proprietăţilor genotipice ale bacteriei-gazdă, cum ar fi, de exemplu, dobîndirea capacităţii de sinteză a unor substanţe noi. De exemplu, în urma lizogenizării cu un anumit fag temperat, o tulpină de bacil difteric devine capabilă să sintetizeze o exotoxină foarte activă.

Relaţia profag-bacterie este deci o *relaţie de tip simbiotic*, în sensul că implică o convieţuire fără efecte nocive pentru vreunul din parteneri, ceea ce asigură atît fagului cît şi celulei-gazdă a supravieţuire îndelungată.

Descoperirea lizogeniei şi cunoaşterea amănunţită a mecanismului ei au avut o influenţă deosebit de fecundă în biologie. Acest fenomen, reprezentînd în aparenţă un caz particular cu importanţă limitată, a permis o serie de deducţii teoretice — unele confirmate ulterior — în domenii de cercetare foarte diferite, cum ar fi cele care privesc episomii, transferul de material genetic la bacterii, ipotezele privind originea virusurilor, mecanismul transformării canceroase sub influenţa virusurilor oncogene etc.

4. IMPORTANŢA FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE. APLICAŢII PRACTICE

Bacteriofagii sînt foarte răspîndiţi în natură, fiind întîlniţi practic în toate mediile în care se găsesc bacterii: apă, sol, intestinul animalelor etc.

Fagii au un rol deosebit în ecologia şi evoluţia bacteriilor. Ei pot grăbi mult procesele foarte lente ale evoluţiei pe calea selecţiei naturale, acţionînd ca un factor important de variabilitate a bacteriilor, graţie fenomenului de transducţie (transferul prin intermediul fagului temperat al unui fragment de material genetic bacterian de la o bacterie la alta, diferită genetic).

Fagii există şi se menţin în natură în special ca *fagi temperaţi*, găzduiţi sub formă de p r o f a g i în celule lizogene. Dar, deoarece trec uneori în faza vegetativă cu eliberare de *fagi litici*, ei contribuie în anumite medii la reducerea numerică a populaţiilor sensibile. În medicină, acţiunea litică a fagului este folosită pentru tratamentul unor infecţii locale, în special urinare, în multe cazuri cu rezultate bune. În industria fermentativă, apariţia unui fag virulent capabil să lizeze tulpinile de microorganisme utilizate în fermentaţii sau biosinteze poate produce pagube însemnate.

În sfîrşit, specificitatea relaţiei fag-bacterie a făcut posibilă elaborarea unui procedeu de identificare şi clasificare a bacteriilor în funcţie de sensibilitatea lor faţă de un anumit fag sau grup de fagi, procedeu denumit *lizotipie* sau *tipizare prin fag*, larg folosit în diagnosticul bacteriologic şi în studiile de sistematică bacteriană.

Scanned with OKEN Scanner

ORGANIZAREA CELULARĂ A MICROORGANISMELOR

Microorganismele fac parte din regnul *Protista*, diviziune taxonomică propusă de Haeckel în 1866 pentru a reuni organismele unicelulare. Protistele reprezintă un grup extrem de numeros şi eterogen de organisme a căror structură celulară este relativ simplă şi nediferenţiată.

Celula este cea mai mică unitate de organizare a unui sistem viu, capabilă de existenţă autonomă în condiţii de mediu adecvate, de înlocuire a propriei sale substanţe şi de creştere şi dezvoltare a structurii sale prin schimburi active de substanţe cu mediul exterior în procesul de metabolism, precum şi de multiplicare prin reproducere sub formă de unităţi noi, asemănătoare ei.

În funcţie de tipul lor de organizare celulară, organismele se pot împărţi în trei categorii: *1) organisme unicelulare*, avînd ca prototip bacteriile, diferite între ele prin formă, mărime, detalii de structură internă şi capacităţi funcţionale; *2) organisme coenocitice*, ca mixomicetele, sifomicetele şi algele sifonale, constînd dintr-o masă de citoplasmă multinucleată lipsită de sisteme de membrane care să delimiteze unităţi celulare mononucleate; *3) organisme pluricelulare* reprezentate ca forme extreme, pe de o parte de „organisme" constituite din unităţi structurale identice, lipsite de specializare şi diferenţiere funcţională, dar dispuse în mod caracteristic, aşa cum este alga brună *Dictyosiphon*, iar pe de altă parte de organisme alcătuite din celule diferenţiate structural şi funcţional, asociate în sisteme complexe reprezentate de ţesuturi şi organe, aşa cum sînt plantele şi animalele superioare.

Din punctul de vedere al organizării lor interne, celulele sînt de două tipuri: *1) procariot*, caracteristic pentru protistele vegetale inferioare *(Schizophyta)*, incluzînd bacteriile *(Schizomycetes)* şi algele albastre *(Schizophyceae)* şi *2) eucariot*, specific pentru protistele superioare (fungi microscopici, celelalte alge unicelulare şi protozoarele) şi pentru organismele pluricelulare vegetale şi animale.

1. CARACTERELE GENERALE ALE CELULELOR PROCARIOTE

Celulele procariote au un *nucleu primitiv netipic*, pentru care este mai adecvată denumirea de „nucleoid". Acesta constă exclusiv dintr-un corp cromatinic (alcătuit din ADN), care nu este asociat cu un nucleol şi nu este separat de citoplasmă printr-o membrană nucleară. Informaţia genetică depozitată în această formaţiune este codificată într-o singură moleculă de ADN, reprezentînd unicul cromozom al celulei aflate în stare de repaus; în cursul procesului de multiplicare, în citoplasma încă nedivizată pot exista mai mulţi cromozomi

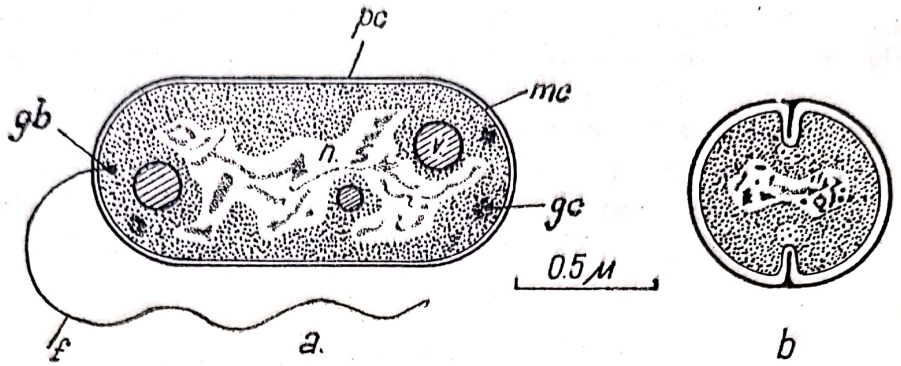


Fig. 88. Reprezentare schematică a unei celule procariote. Secţiune longitudinală (*a*) şi transversală (*b*) printr-o celulă bacteriană:
pc — perete celular; *mc* — membrana citoplasmatică; *n* — nucleu; *v* — vacuolă; *gc* — granulaţii din citoplasmă; *f* — flagel legat de granulaţie bazală (*gb*).

care însă sînt identici, rezultînd din dedublarea unui aceluiaşi cromozom. Diviziunea nucleoidului, care precede diviziunea celulară, se face prin dedublarea longitudinală a cromozomului, proces foarte simplu, care nu comportă — ca mitoza — faze ciclice de restructurări morfologice ale cromatinei nucleare.

Celulele procariote se reproduc în general pe cale *asexuată* — prin diviziune directă sau sciziparitate a celulei ajunsă la limita de creştere — şi numai excepţional pe cale sexuată, prin conjugare, proces sexual de tip special („parasexual") survenind la unele specii de bacterii. Din această cauză, celulele procariote sînt în mod normal haploide şi întru totul identice celulei parentale, aşa cum cromozomii lor sînt identici celor parentali; în mod excepţional, ca urmare a procesului de conjugare, celula femelă devine parţial şi temporar diploidă — un *merozigot* — starea de diploidie încetînd însă prin reconstituirea stării haploide, survenită înaintea primei diviziuni prin sciziparitate care urmează conjugării.

Citoplasma celulelor procariote este lipsită de curenţi citoplasmatici. Ea nu conţine organite delimitate de membrane, aşa cum ar fi, de exemplu, cloroplaştii. De asemenea, în interiorul ei nu există un reticul endoplasmic organizat, ci numai sisteme membranoase izolate, mai mult sau mai puţin rudimentare.

Cu excepţia genului *Mycoplasma* din grupul bacteriilor, celulele procariote au toate un perete celular rigid, care îşi datoreşte această proprietate prezenţei în structura lui a unui polimer complex — *un mucocomplex* — reprezentînd suportul principal al rezistenţei lui mecanice. Acest polimer este alcătuit din două aminozaharuri, *N*-acetil-glucozamina şi acidul *N*-acetil-muramic, şi din cîţiva *D*-aminoacizi: *D*-alanina, acidul *D*-glutamic şi acidul diaminopimelic; acizii *N*-acetil-muramic şi diaminopimelic sînt proprii exclusiv protistelor inferioare, la care sînt prezenţi numai în structura peretelui celular.

Celulele procariote nu sînt capabile de mişcări amoeboide, din cauza rigidităţii peretelui lor. În lipsa unor organe accesorii de locomoţie, ele nu se pot deplasa decît printr-o mişcare de alunecare pe substrate adecvate, realizînd

o înaintare lentă, neînsoţită de modificări morfologice, tip de locomoţie caracteristic algelor albastre şi mixobacteriilor; ele se deplasează însă cu uşurinţă dacă sînt înzestrate cu organite accesorii, sub formă de flageli cu structură internă simplă (tipul de locomoţie bacterian).

Deşi mărimea celulelor nu constituie în sine un caracter distinctiv al procariotelor, celulele de acest tip reprezentate de protistele inferioare au o mărime medie inferioară aceleia a celulelor eucariote, tipice pentru celelalte organisme.

2. CARACTERELE GENERALE ALE CELULELOR EUCARIOTE

Celulele eucariote au un *nucleu tipic*, veritabil, de unde şi denumirea lor de *eucariote*. În stare de repaus, acest nucleu conţine, în afară de cromatina granulată sau reticulară (constituită din ADN), unul sau mai mulţi nucleoli (formaţi din ARN) şi este separat de citoplasmă printr-o membrană dublu stratificată străbătută din loc în loc de pori. Informaţia genetică depozitată în cromatina nucleară sub formă codificată prin succesiunea specifică a bazelor ADN, se repartizează la începutul diviziunii nucleare în unităţile structurale individualizate de ADN, denumite *cromozomi*, al căror număr — constant pentru o specie dată — este mai mare decît unu. Diviziunea nucleului, care precede diviziunea celulară, se face prin *mitoză* (de la gr. *mitos*=filament), proces ciclic denumit şi cariochineză, evoluînd în mai multe faze asociate cu modificări morfologice; ea este caracterizată prin rearanjarea cromatinei în filamente, contracţia acestora în formă de cromozomi şi dedublarea cromozomilor urmată de împărţirea lor în două grupuri egale de cromozomi-fii, care intră în alcătuirea celor doi nuclei-fii.

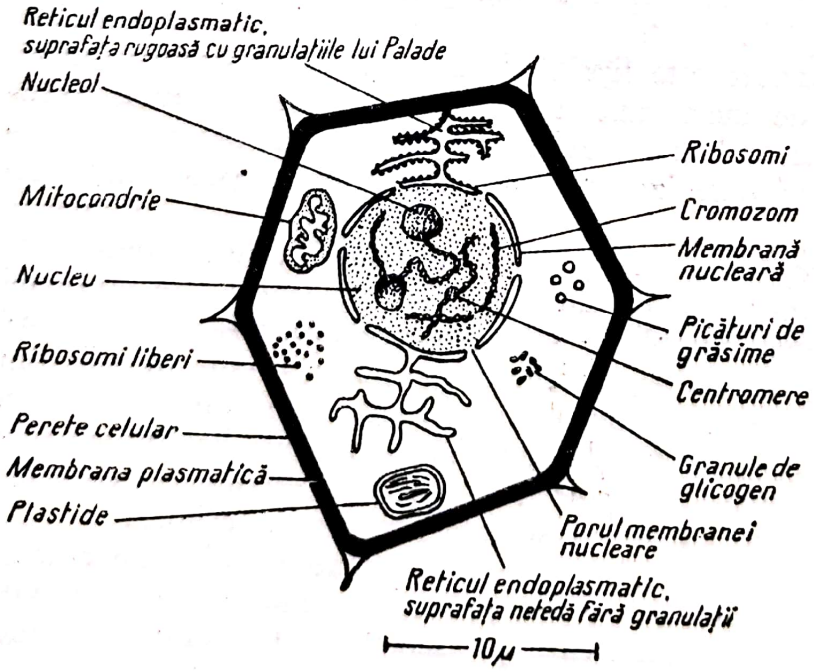


Fig. 89. Reprezentare schematică a unei celule vegetale eucariote. Principalii constituenţi nu sînt reprezentaţi la scară (după Wattson).

Scanned with OKEN Scanner

Celulele eucariote se pot reproduce şi *pe cale sexuată*, prin fuziunea a două celule reproducătoare diferenţiate sexual — cel puţin din punct de vedere funcţional, dacă nu şi morfologic — reprezentînd cei doi gameţi, ♂ şi ♀, proces din care rezultă *celula-ou* sau *zigotul*. Întrucît prin unirea gameţilor şi formarea zigotului numărul cromozomilor devine dublu, trecerea de la o generaţie la alta necesită — pentru ca numărul cromozomilor să nu crească indefinit — reducerea la jumătate a numărului de cromozomi în cursul unei diviziuni care precede formarea gameţilor, aşa-numita diviziune reducţională, reducere cromatică sau meioză. Zigotul şi celulele derivate din el prin diviziuni mitotice sînt deci diploide (numărul cromozomilor lor fiind $2n$), în timp ce gameţii, ca rezultat al unei diviziuni meiotice, sînt haploizi (avînd numai n cromozomi).

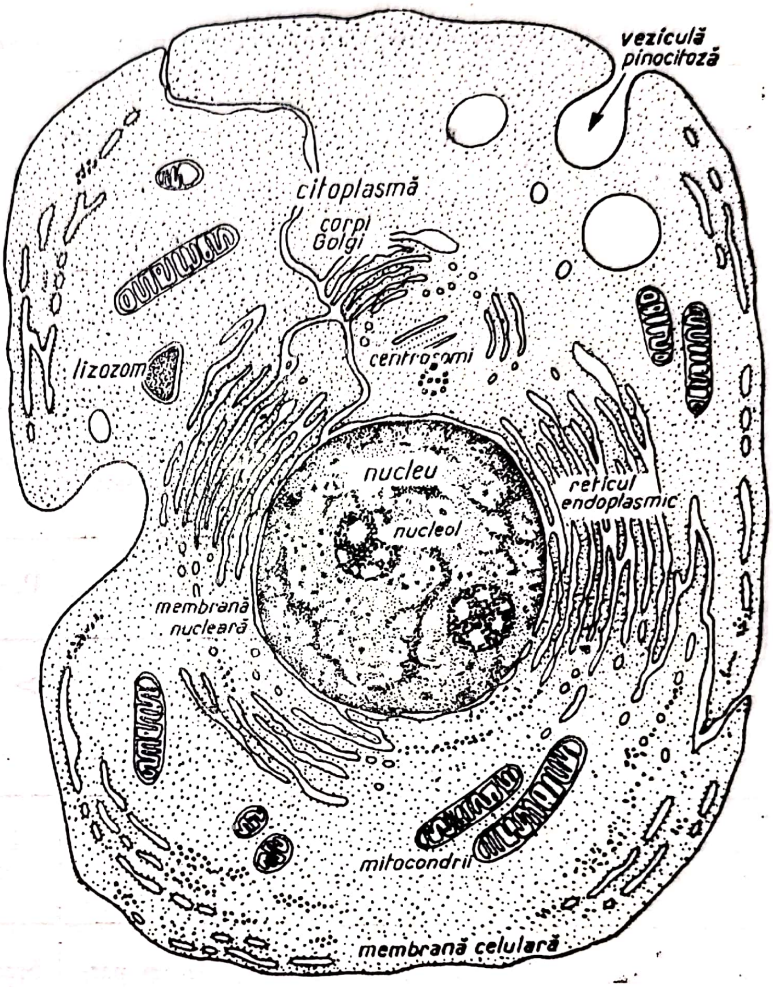


Fig. 90. Structura internă a unei celule eucariote animale (după Brachet).

Citoplasma celulelor eucariote este în permanenţă străbătută de curenţi citoplasmatici. Ea conţine structuri limitate de membrane denumite „plaste", aşa cum sînt, de exemplu, mitocondriile şi cloroplaştii. În interiorul ei se găseşte de asemenea un sistem membranos diferenţiat — *reticulul endoplasmatic*.

Peretele celular rigid lipseşte la celulele animale — care sînt delimitate numai de o membrană citoplasmatică alcătuită dintr-un mozaic de proteine şi lipide — şi este prezent la celulele vegetale sub forma unui înveliş gros, constituit la fungi din c h i t i n ă, iar la plantele verzi din c e l u l o z ă.

În ceea ce priveşte locomoţia, celulele lipsite de un perete rigid se pot deplasa prin *mişcări amoeboide*, iar cele care au un asemenea perete, dacă sînt mobile, datoresc această proprietate funcţiei unor organite accesorii reprezentate prin *cili* sau *flageli* cu o structură complexă tipică (tab. 5).

TABELUL 5

CARACTERE DIFERENŢIALE ALE CELULELOR PROCARIOTE ŞI EUCARIOTE

	Celule procariote	Celule eucariote
Organisme cu acest tip de organizare	Bacterii, alge albastre	Fungi, alge verzi, protozoare, plante şi animale superioare
Perete celular	Rigid: mucocomplex cu constituţie chimică foarte caracteristică	Rigid: chitină (fungi), celuloză (alge verzi şi plante superioare) sau absent (celule animale)
Nucleu	Primitiv, netipic, fără formă caracteristică (nucleoid sau material nuclear)	Tipic („adevărat") cu nucleol
Membrana nucleară	Absentă	Prezentă (dublă, străbătută de pori)
Cromozom	Unic — „genofor", „lineom" sau „nucleosom" — (moleculă circulară ADN); în anumite condiţii 2—4 într-o celulă, dar identici (haploid)	> 1; număr constant pentru specie
Tipul de diviziune obişnuit	Diviziune directă (amitoză)	Diviziune indirectă (mitoză sau cariochineză) cu fiaze caracteristice
Înmulţire sexuată	Rară (ca o excepţie) şi de tip particular: „parasexualitate". Formare de zigot parţial şi tranzitoriu diploid (merozigot)	Frecventă; formarea gameţilor (haploizi) precedată de meioză (diviziune reducţională); zigot diploid
Curenţi citoplasmatici	Absenţi (excepţional, foarte slabi)	Prezenţi
Reticul endoplasmic	Absent; sisteme membranoase izolate mai mult sau mai puţin rudimentare (mezozomi)	Prezent, cu organizare caracteristică
Mitocondrii	Absente	Prezente
Organe de locomoţie	Facultative: cili de tip special	Facultative: cili sau flageli cu organizare complexă
Mişcare amoeboidă	Absentă (perete celular rigid)	Absentă la celule cu perete rigid; prezentă la celule fără perete rigid
Dimensiuni	Mărime medie inferioară aceleia a eucariotelor	Mai mari decît procariotele

ANATOMIA BACTERIILOR

1. MORFOLOGIE

Forma bacteriilor este controlată genetic; de aceea, deşi ea variază destul de mult în funcţie de condiţiile de mediu, polimorfismul acestor microorganisme este relativ limitat şi caracterizat, de cele mai multe ori, prin predominanţa formei tipice pentru specia dată.

Deoarece forma bacteriilor este greu de apreciat direct în mediile naturale, cunoştinţele de morfologie bacteriană se referă, de obicei, la celulele cultivate în condiţii artificiale de laborator, în care caz forma celulei poate fi influenţată de vîrsta culturii, de compoziţia chimică a mediului, de temperatură etc. Datorită acestui fapt, forma bacteriilor — care reprezintă un criteriu taxonomic important — se apreciază în mod convenţional pe celule provenite din culturi tinere, în faza de creştere activă, pe medii de cultură corespunzătoare şi în condiţii optime de temperatură, tensiune O_2, *p*H etc.

În culturi vechi, în care cele mai multe bacterii sînt pe cale să degenereze sau să moară, apar celule cu forme aberante (cu aspect de *y*, ramificate, filamentoase etc.). Aceste forme degenerate — *de involuţie* — care se observă şi în cazul cultivării în condiţii improprii de mediu (temperatură nepotrivită, concentraţii mari de săruri anorganice, doze subletale de substanţe antibacteriene) rezultă din interferenţa unor acţiuni nocive cu procesul de diviziune normală, sau din alterarea mecanismelor de permeabilitate selectivă, urmată de imbibiţia cu apă şi autoliza structurilor celulare prin acţiunea enzimelor proprii.

Forma bacteriilor. După forma celulei, bacteriile pot fi grupate în trei mari categorii: *1) bacterii sferice; 2) bacterii cilindrice; 3) bacterii spiralate* sau *elicoidale.*

La cele mai multe specii, celulele-fiice rezultate din diviziune se separă şi rămîn independente, datorită agitării mecanice, curenţilor de convecţie din mediu, mişcării browniene şi, mai ales, activităţii cililor, în cazul bacteriilor mobile. La alte specii însă, aparţinînd în special grupului bacteriilor sferice şi uneori al celor cilindrice, celulele-fiice nu se despart la sfîrşitul diviziunii, ci formează grupări caracteristice cu mare valoare taxonomică.

Modul de grupare a celulelor bacteriene după diviziune este în funcţie de raportul geometric dintre diferitele planuri succesive de diviziune şi de tendinţa celulelor-fiice de a rămîne unite unele de altele. După forma celulelor

şi modul lor de grupare în urma procesului de diviziune, bacteriile se împart în mai multe tipuri şi subtipuri morfologice:

1) *Bacteriile sferice* sau c o c i i au formă sferică, ovoidală, elipsoidală, reniformă, uneori neregulată sau parţial poliedrică, diametrele celulei fiind aproximativ egale. Forma sferică este adesea modificată de diferiţi factori de mediu; de aceea, este discutabil dacă în stare vie celula bacteriană este realmente sferică. În funcţie de poziţia celulelor-fiice după diviziune, cocii prezintă următoarele şase subtipuri morfologice: *a*) *cocul simplu* sau *izolat*, la care celulele rezultate din diviziune rămîn independente; *b*) *diplococul* (de la gr. *diplos*=dublu), la care diviziunea se face după planuri succesive paralele, celulele rezultate rămînînd grupate cîte două *(Diplococcus pneumoniae)*; *c*) *streptococul* (de la gr. *streptos*=împletit), la care diviziunea se face, de asemenea, după planuri succesive paralele, dar celulele rezultate formează lanţuri de lungimi variabile, ca un şirag de mărgele *(Streptococcus pyogenes)*; *d*) *tetracocul* sau *tetrada*, la care planurile succesive de diviziune sînt perpendiculare unele faţă de altele, iar celulele rezultate sînt dispuse în grămezi de patru elemente *(Micrococcus tetragenes)*; *e*) *sarcina*, la care planurile de diviziune sînt orientate în trei direcţii diferite ale spaţiului şi sînt reciproc perpendiculare unul pe altul (al doilea pe primul şi al treilea pe primele două), de unde rezultă o grupare în cuburi sau pachete (baloturi). *(Sarcina flava, S. aurantiaca)*; *f*) *stafilococul*, la care planurile succesive de diviziune sînt dispuse în cîteva direcţii, iar organismele rezultate se aranjează în grupări neregulate în formă de ciorchine *(Staphylococcus aureus)*.

2) *Bacteriile cilindrice*, cunoscute mai ales sub denumirea comună de b a c i l i, au formă de bastonaşe, diametrul lor longitudinal fiind mai mare decît cel transversal. Raportul dintre cele două axe variază mult, unele bacterii cilindrice putînd lua un aspect filamentos, iar altele avînd o formă aproape sferic-ovalară (cocobacili). Acestea din urmă sînt uneori greu de diferenţiat de coci; în culturi pure există însă totdeauna cîteva celule suficient de lungi pentru a indica natura lor cilindrică. Bacilii sînt *drepţi* sau *uşor încurbaţi* la mijloc sau la una din extremităţi. Capetele lor pot fi tăiate drept ca la *Bacillus anthracis*, sau rotunjite ca la majoritatea germenilor. Marginile laterale ale celulei sînt de obicei paralele dar pot fi şi apropiate la extremităţi în formă de suveică *(Fusobacterium fusiformis)*, sau îndepărtate şi rotunjite la una sau la ambele extremităţi, în formă de măciucă sau de pişcot *(Corynebacterium)*. Bacilii pot fi grupaţi cîte doi (diplobacili), în lanţuri cu lungimi variabile (streptobacili) sau în pali-

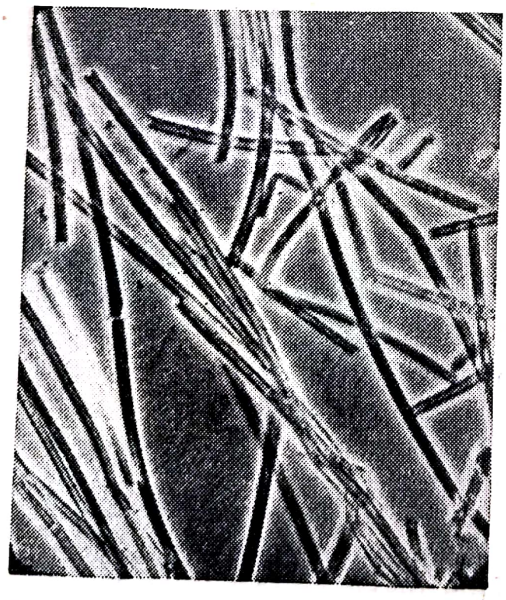


Fig. 91. Bacterie cilindrică cu aspect filamentos.

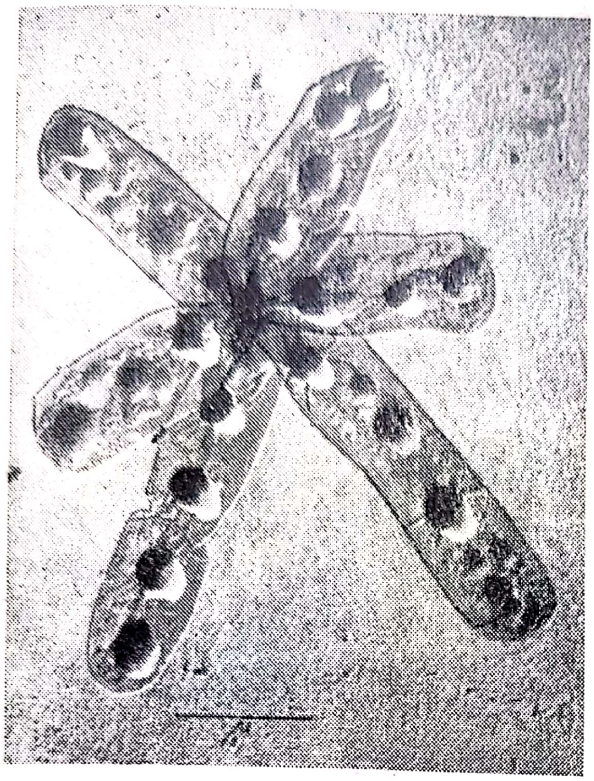


Fig. 92. Gruparea celulelor bacteriene în rozetă (după Knösel).

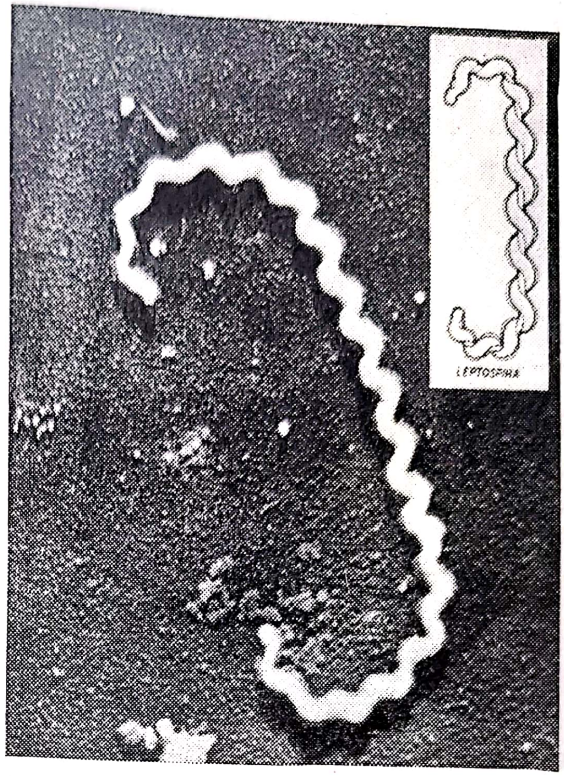


Fig. 93. Bacterie spiralată din genul *Leptospira* (după Scanga).

sadă (ca scîndurile unui gard). Acest ultim tip de aşezare, în care celulele rămîn apropiate şi paralele în sensul axului lor lung, rezultă dintr-o mişcare de basculare a celulei-fiice, avînd ca punct de sprijin peretele transvers recent separat. În sfîrşit, unele bacterii *(Agrobacterium stellulatum, Ag. radiobacter, Phyllobacterium stappi)* formează grupuri caracteristice în formă de rozetă sau de stea.

3) *Bacteriile spiralate* sau *elicoidale* cuprind trei subtipuri morfologice: *a) vibrionul,* bacterie în formă de virgulă, *(Vibrio cholerae); b) spirilul,* în formă de spirală cu mai multe tururi de spiră rigide *(Spirillum volutans); c) spirocheta,* în formă de spirală cu mai multe tururi flexibile, care se pot strînge sau relaxa (genurile *Borrelia, Treponema* şi *Leptospira*).

În ceea ce priveşte cauzele grupării bacteriilor după diviziune, există cîteva ipoteze:

a) Diviziunea celulelor bacteriene se realizează prin intermediul unui sept transversal care creşte centripet de pe suprafaţa internă a peretelui celular. La bacteriile care se separă după diviziune, ar exista un mecanism de scindare a septului în două foiţe, în timp ce la alte specii, acesta ar rămîne nedivizat, realizînd unirea celulelor în grămezi sau lanţuri.

b) În unele cazuri, septul transversal s-ar forma incomplet, astfel încît celulele rezultate din diviziune ar rămîne legate printr-o şuviţă de citoplasmă, care ar face între cele două celule o punte de legătură echivalentă plasmodesmei, pusă în evidenţă între celulele multor ţesuturi vegetale şi animale.

c) În sfîrşit, după A. R. Prévot, la unele specii de bacterii sferice gruparea s-ar datora unei substanţe vîscoase, gumoase, sintetizată de celula bacteriană şi depusă pericelular — fie difuz pe toată suprafaţa celulei, fie localizat în anumite regiuni — determinînd diferite tipuri de polarizare a celulelor, şi anume: *polarizare radiară simplă* (diplococ),

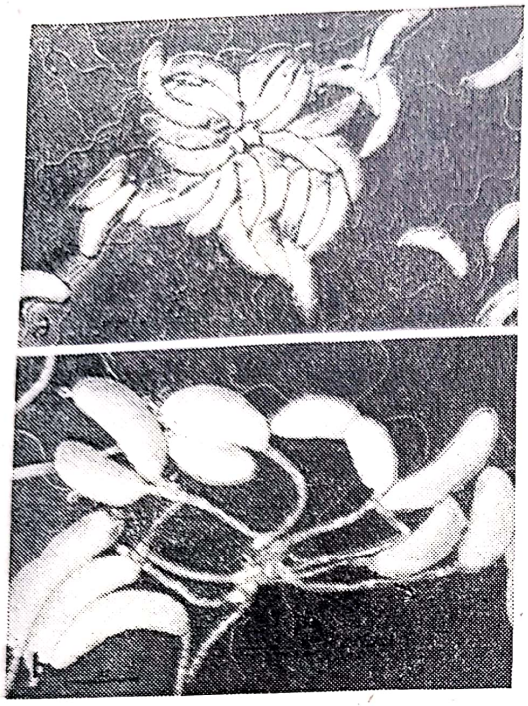


Fig. 94. Celule tinere de *Caulobacter* aşezate în formă de rozetă, reunite printr-o masă comună de material aderent (*a*) şi celule pedunculate grupate în rozetă (*b*) prin intermediul pedunculilor lor (după Poindexter).

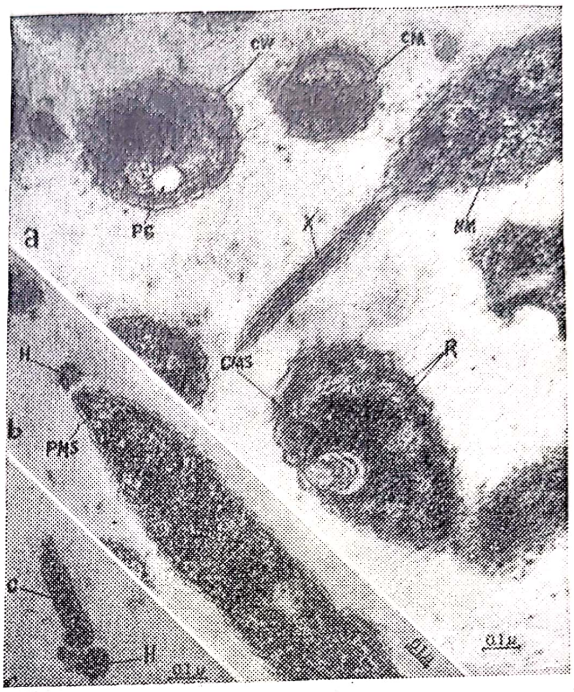


Fig. 95. Secţiune prin bacterii din genul *Caulobacter:*

a — secţiune printr-o bacterie; *b* — secţiune printr-un peduncul; *c* — secţiune prin extremitatea distală a unui peduncul; *CW* — perete celular; *CM* — membrana citoplasmatică; *CMS* — structuri membranoase citoplasmatice; *NM* — material nuclear; *PG* — poli-β-hidroxibutirat; *R* — ribosomi; *C* — „miezul" pedunculului; *X* — peretele pedunculului; *H* — material aderent (după Poindexter).

diametrală simplă (streptococ), *biradiară* (tetracoc), *bidiametrală* (sarcina) şi *circumferenţială* (stafilococ).

În afara acestor tipuri morfologice întîlnite curent, mai există şi bacterii de o formă mai deosebită, rezultînd în general dintr-o diferenţiere datorită condiţiilor ecologice.

4) *Bacteriile pedunculate* din genul *Caulobacter*, larg răspîndite în mediile acvatice naturale, trăiesc probabil ca ectocomensali pe microorganisme planctonice mai mari — cu care sînt parteneri la consumarea hranei — sau se fixează pe substraturi solide neanimate. Celula lor cilindrică, fuziformă sau curbată asemenea unui vibrion, elaborează un peduncul, care este format dintr-o prelungire tubulară foarte fină, de cîteva ori mai lungă decît corpul celular, terminată cu un fel de „ventuză" sau „crampon", constînd dintr-o umflătură cu structură acelulară neregulată, alcătuită din material lipicios aderent de substraturi. La fiecare diviziune se formează o celulă-fiică apicală flagelată, care se liberează şi se deplasează liber, „roind" cîtva timp în mediu, după care îşi pierde flagelul, în locul căruia începe să se formeze pedunculul. Materialul lipicios secretat încă de la început în regiunea bazei flagelului ajunge final să fie localizat în vîrful pedunculului, alcătuind „ventuza" sau „cramponul" lui terminal. În culturi pure şi dense, mai multe celule care

„roiesc" aderă între ele prin „ventuzele" pedunculilor, ceea ce determină formarea unor grupuri de celule aranjate în rozetă.

5) *Bacteriile filamentoase* au ca prototip pe *Sphaerotilus natans*, prezent în apele dulci bogate în substanţe organice. Fiecare individ este format dintr-un lanţ de celule înconjurate de o teacă delicată cu peretele neted, care, în condiţii de mediu favorabile, poate acumula hidroxid de fier sau de mangan. Reproducerea se face prin liberarea pe la una dintre extremităţile tecii a unor celule flagelate polar, urmată de constituirea prin diviziune a unui nou lanţ de celule înconjurate de o teacă.

Bacteriile din genul *Caryophanum*, care trăiesc în bălegarul de vacă, se prezintă sub formă de filamente groase de 4 μ şi lungi de 40 μ, alcătuite din 10—30 de celule cilindrice.

2. DIMENSIUNILE BACTERIILOR

Bacteriile sînt organisme cu dimensiuni foarte mici (în medie 0,5—1 μ × ×3—6 μ). Cele mai mici dintre ele se apropie chiar de limita de rezolvare a microscopului optic (*Spirillum parvum:* 0,1—03, μ ×1—3 μ; *Vibrio percolans:* 0,3—0,4 ×0,4—2 μ) (tab. 6).

Densitatea sau *greutatea specifică* a celulei bacteriene vii (în stare umedă) variază între 1,07 şi 1,30. Valoarea acestui indice este în funcţie de proporţia relativă a substanţelor celulare cu densitate diferită de aceea a apei ($D=1$) [1]. Deoarece compoziţia chimică a bacteriilor este variabilă, chiar la aceeaşi spe-

TABELUL 6

DIMENSIUNILE CÎTORVA SPECII DE BACTERII, ÎN MICRONI
(după date din Bergey)

Specia	Dimensiuni în microni		Specia	Dimensiuni în microni	
	Lăţime	Lungime		Lăţime	Lungime
Azotobacter chroococcum	2—3	3—6	*Gallionella ferruginea*	0,5—0,6 0,6—3,3	1,2—1,5 200
Bacillus cereus	1,0—1,2	3,0—5,0	*Mycobacterium tuberculosis*	0,3—0,6	0,5—4,0
Bacillus megaterium	1,2—1,5	2,0—4,0	*Rhizobium leguminosarum*	0,5—0,9	1,2—3
Beggiatoa gigantea	Φ 26—55		*Rhodospirillum rubrum*	0,5—1,5	2—50
Borrelia recurrentis	0,35—0,5	8,0—16,0	*Salmonella typhosa*	0,6—0,7	2,0—3,0
Chromatium okenii	5,6—6,3	7,5—15,0	*Spirillum volutans*	1,5	13,0—14,0
Clostridium tetani	0,4—0,6	4,0—8,0	*Staphylococcus aureus*	Φ 0,8—1	
Corynebacterium diphteriae	0,8—1,0	1,0—8,0	*Treponema pallidum*	0,25—0,3	6—14

[1] Lipidele au densitatea sub 1, glucidele 1,4—1,6, proteinele 1,5, acizii nucleici 2, sărurile minerale 2—2,5.

cie, în funcţie de condiţiile de mediu sau de vîrsta celulei, densitatea lor este caracteristică numai în raport cu anumite condiţii de creştere. Astfel celulele tinere, care sînt turgescente, au o densitate mai mică decît cele bătrîne, iar la bacteriile cultivate pe medii lichide valoarea ei este mai mică decît la cele cultivate pe medii solidificate.

Datorită densităţii lor mici, bacteriile rezistă la sedimentare spontană în medii gazoase şi lichide, din care însă pot fi separate prin centrifugare.

Suprafaţa celulei bacteriene se poate calcula, încadrînd bacteriile într-o formă geometrică regulată, pe baza dimensiunilor celulei. Astfel *B. anthracis* are o suprafaţă de 33 μ^2 (33×10^{-8} cm^2), un coc cu $\varnothing$ 1μ are 3,15 μ^2, iar *Brucella melitensis* 0,25 μ^2.

Volumul celulei bacteriene poate fi apreciat cu ajutorul formulelor de calcul aplicate corpurilor geometrice regulate. El variază între 8,75 μ^3 ($8{,}75 \times 10^{-12}$ cm^3) pentru o bacterie mare ca *B. anthracis*, 1,5 μ^3 pentru *Salmonella typhi*, 0,52 μ^3 pentru un coc, 0,011 μ^3 pentru *Brucella* şi 0,004 μ^3 pentru *Pasteurella tularensis*.

Ca termen de comparaţie, amintim că o celulă sanguină, de exemplu un limfocit, are volumul de 524 μ^3.

Ca şi la alte vieţuitoare, la bacterii pare să existe o limită minimă de mărime care permite gradul de organizare indispensabil unui metabolism independent; sub această limită, organismele sînt în mod obligatoriu parazite intracelulare, un volum prea mic fiind incompatibil cu prezenţa enzimelor proprii, necesare metabolismului, creşterii şi multiplicării.

Greutatea unei bacterii vii poate fi calculată împărţind greutatea unei anumite mase de celule la numărul unităţilor celulare componente. Ea este de $9{,}62 \times 10^{-12}$ g pentru o celulă de *B. anthracis*, $0{,}57 \times 10^{-12}$ g pentru un coc cu $\varnothing$ 1 μ şi $0{,}012 \times 10^{-12}$ g pentru o bacterie mică de tipul celor din genul *Brucella*. Celulele de *E. coli*, care sînt de 500 de ori mai mici decît o celulă mijlocie vegetală sau animală ($\varnothing$ 10 μ) au greutatea de 2×10^{-12} g (10^{12} daltoni), respectiv de 6×10^6 ori mai mare decît greutatea unei molecule de apă (g.m.=18).

Raportul dintre suprafaţa celulei şi greutate are o valoare foarte ridicată la bacterii. În cazul unui coc cu $\varnothing$ 1 μ, acest raport este de 55 000, la *B. anthracis* el este egal cu 35 000, iar la *Br. melitensis* cu 200 000. Acelaşi raport la om $\left(\frac{24\,000\ cm^2}{70\,000\ g}\right)$ este de 0,25, respectiv de 140 000 de ori mai mic decît la *B. anthracis*, de 200 000 de ori mai mic decît la un coc şi de 800 000 de ori mai mic decît la *Brucella*.

Valoarea raportului dintre suprafaţă şi volum este foarte mare la bacterii, comparativ cu alte organisme, şi poate fi asemănată aceluia al particulelor de substanţe în stare de dispersie coloidală. Datorită acestui fapt, o cantitate mică de bacterii, de ordinul a 1 ml masă compactă de celule ale unui coc, poate să conţină 10^{12}, adică 1 000 miliarde celule însumînd o suprafaţă totală de contact cu mediul de circa 3,15 m^2. Mărimea considerabilă a acestei suprafeţe reactive de la interfaţa celulară mediu este deosebit de importantă deoarece practic toate substanţele care intră şi ies din celulă trec prin această zonă.

Pentru aprecierea semnificaţiei concrete a acestui raport, este suficient să ne imaginăm că bacteriile ar proveni dintr-un organism ipotetic în formă de cub cu o greutate de 6 g şi latura de 1 cm, prin fragmentarea lui în cuburi din ce în ce mai mici, după cum urmează:

Număr cuburi	Latura	Suprafaţa, cm²	Greutatea, g	Raport S/G
1	1 cm	6	6	1
10^3	1 mm	60	6	10
10^6	100 μ	600	6	100
10^9	10 μ	6 000	6	1 000
10^{12}	1 μ	60 000	6	10 000

Suprafaţa totală de contact cu mediul (interfaţa) creşte deci progresiv pe măsura divizării, deoarece aceasta face să apară mereu noi suprafeţe. Pentru comparaţie, trebuie arătat că valoarea raportului S/V este la om de 0,3, la un ou de găină de 1,5, la amoebă de 400.

3. STRUCTURA INTERNĂ A CELULEI BACTERIENE

Datorită dimensiunilor mici şi particularităţilor fizico-chimice ale structurilor componente, organizarea internă a bacteriilor a fost mult timp ignorată sau chiar contestată, unii cercetători considerînd aceste microorganisme pur şi simplu ca un fel de „saci cu enzime".

Cunoaşterea structurii interne a bacteriilor a fost posibilă în urma perfecţionării mijloacelor de cercetare a acestor organisme şi, în special, graţie: *1*) microscopiei electronice pe secţiuni ultrafine; *2*) microscopiei în contrast de fază; *3*) metodelor de citochimie etc. Cu ajutorul acestor metode s-a demonstrat că celula bacteriană este o entitate morfologică şi funcţională, echivalentă din acest punct de vedere celulelor altor organisme şi că are o structură relativ complexă, fiind constituită din următoarele componente: *peretele celular, structurile subparietale, membrana citoplasmatică* şi *mezozomul, citoplasma, ribosomii, materialul nuclear, sporul, cromatoforii* (la bacteriile fotosintetizante), *vacuolele* şi *incluziile* şi, în sfîrşit, *structurile extraparietale (capsula, stratul mucos, cilii* şi *pilii*).

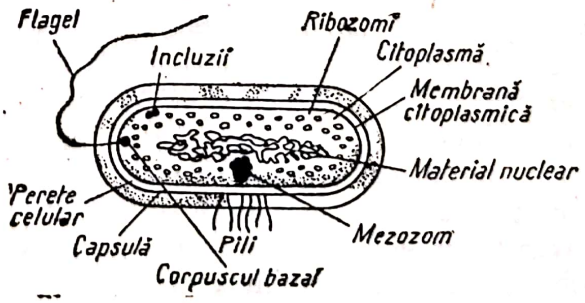


Fig. 96. Reprezentare schematică a principalilor constituenţi structurali ai unei celule bacteriene.

Fig. 97. Perete celular izolat şi pliat: suprafaţa internă este netedă iar cea externă cu structură caracteristică (după Murray).

a. Peretele celular

Celula bacteriană este delimitată de un perete celular bine definit structural şi cu consistenţă rigidă. Situat deasupra membranei citoplasmatice, el este acoperit, la unele specii, de o capsulă sau de un strat mucos pericelular, iar la bacteriile mobile este străbătut de cili sau flageli. Peretele celular al bacteriilor este cunoscut şi sub denumirea de *membrană celulară* sau *membrană bacteriană*.

Existenţa peretelui celular la bacterii a fost bănuită de Conn încă din 1872, pe baza formei relativ constante, a rezistenţei la acţiunea unor factori de mediu şi a posibilităţii de grupare tipică a celulelor bacteriene.

Datorită indicelui lui de refracţie mic, peretele celular este invizibil ori foarte greu vizibil (ca la *Beggiatoa mirabilis*) la celulele vii examinate la microscopul fotonic.

Evidenţierea lui este însă posibilă prin *colorare selectivă* sau prin *examinare la microscopul electronic*. La bacteriile tinere, care au citoplasma abundentă, compactă şi omogenă, peretele celular aderă intim la conţinutul celular subiacent. Cînd citoplasma îşi pierde aceste proprietăţi (la celulele bătrîne sau în curs de liză, plasmoliză etc.), peretele celular devine evident, fiind depărtat de citoplasmă.

Datorită particularităţilor sale, punerea în evidenţă a peretelui celular se poate face fie prin izolarea lui ca structură intactă completă, fie prin modificarea raporturilor lui spaţiale cu citoplasma. Această modificare se poate obţine pe calea desintegrării

Fig. 98. Peretele celular la *Bacillus polymyxa* (microelectronografie după Baddiley).

celulare prin ultrasonare sau agitare cu perle de sticlă, cu ajutorul tehnicii de microdisecţie sau prin provocarea unui şoc osmotic (inducţie de plasmoliză ori plasmoptiză) ori a autolizei celulare. Existenţa şi constituţia chimică a peretelui celular pot fi demonstrate şi indirect, de exemplu prin degradarea lui pe cale enzimatică sub acţiunea lizozimului, enzimă care atacă mucopolizaharidele.

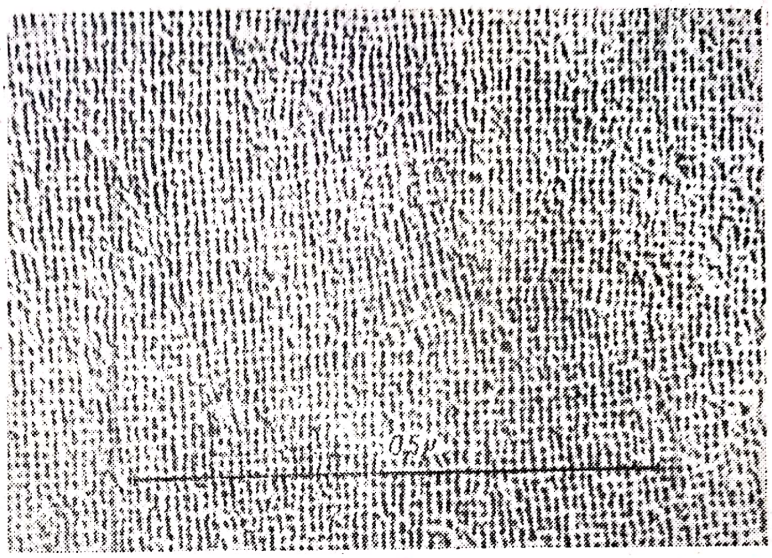


Fig. 99. Structura fină a peretelui celular la *B. polymyxa* evidenţiind aranjarea ordonată a moleculelor de mucopolipeptid (după Baddiley).

Grosimea peretelui celular este în medie de 150 Å (limitele fiind în mod curent de 100—230 Å şi excepţional 400—800 Å) şi reprezintă 20—35% din greutatea uscată a celulei bacteriene.

Ultrastructura peretelui celular a fost studiată la *E. coli* — pe celule normale şi pe celule infectate cu bacteriofag — de către S. de Petris, care a demonstrat prezenţa în grosimea lui a unei structuri asimetrice multistratificate. Stratul extern triplustratificat (*membrana L*) — probabil de natură lipoproteică sau lipopolizaharidică — este gros de 50—55Å şi constă din două straturi electron-dense de 15—20 Å separate de un spaţiu transparent de aceeaşi grosime. *Stratul G*, situat imediat dedesubtul celui extern, este relativ electronoopac, gros de 50—55 Å, omogen sau alcătuit din elemente globulare, probabil de natură proteică, de formă turtită cu Ø 120—140 Å şi grosimea de 50—55 Å. *Stratul M*, transparent, gros de 40—45 Å, care separă peretele celular de membrana citoplasmatică subiacentă, nu este după de Petris un spaţiu gol, aşa cum apare pe microelectrografii, ci o entitate structurală incluzînd un component mucopeptidic.

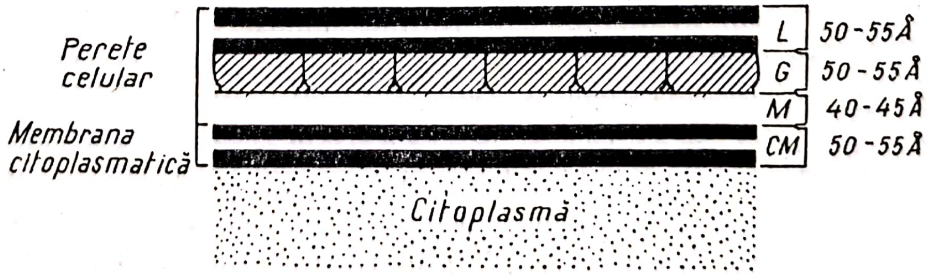


Fig. 100. Reprezentare schematică a structurii învelişurilor celulare la *Escherichia coli* (după De Petris).

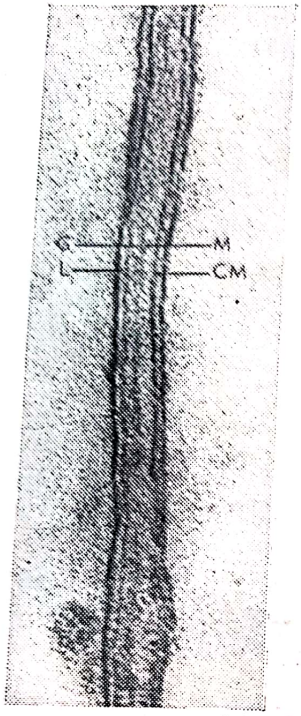


Fig. 101. Structura fină a învelişurilor celulei bacteriene evidenţiată după liza celulei prin fag. Regiunea dreaptă a imaginii corespunde spaţiului intracelular. Învelişul complet al celulei bacteriene constă din peretele celular cuprinzînd membrana *L*, straturile *G* şi *M* şi din membrana citoplasmatică (*CM*) tristratificată (după De Petris).

Acest tip de organizare nu este însă universal. La *Spirillum serpens*, peretele celular neted pe suprafaţa sa internă are o suprafaţă externă cu o structură bine vizibilă rezultată din aşezarea simetrică, hexagonală, a unor subunităţi de 20×60 Å în jurul unei cavităţi centrale.

Compoziţie chimică. Peretele celular al tuturor bacteriilor este caracterizat prin prezenţa unui constituent care este esenţial pentru rigiditatea lui şi care reprezintă structura parietală de bază. Din punct de vedere chimic, acest constituent este un *mucocomplex* sau un *mucopeptid*, adică un heteropolimer alcătuit din monomeri de tip glucozaminopeptidic (zaharuri aminate legate de aminoacizi specifici). De această structură de bază se leagă alţi compuşi care alcătuiesc structura specială a peretelui şi a căror complexitate şi pondere în alcătuirea peretelui celular sînt variabile, după cum este vorba de bacterii Gram-pozitive sau Gram-negative. În timp ce la unele bacterii Gram-pozitive (*S. aureus*) structura de bază reprezintă 80% din masa peretelui celular, la *E. coli*, ea constituie numai 20% din ea, restul revenind structurii speciale. Bacteriile Gram-pozitive au un perete cu structură mai simplă în alcătuirea căreia intră ca principali componenţi mucopeptide, polizaharide solubile ,acizi teichoici şi numai urme de lipide şi proteine. La unele specii din acest grup peretele celular este aproape în întregime constituit din mucopeptide aşezate ordonat, ceea ce-i conferă o structură fină bine definită.

Peretele celular al bacteriilor Gram-negative este mult mai complex din punct de vedere chimic, deoarece conţine cantităţi mari de lipide (8—30%) asociate cu polizaharide şi proteină asociată cu mucocomplex; acizii teichoici lipsesc însă din constituţia lui.

Unii constituenţi ai mucopeptidelor parietale sînt foarte caracteristici: de exemplu, acidul muramic (prezent numai în peretele celulei bacteriene şi în precursorii lui), acidul diaminopimelic (întîlnit numai la bacterii şi la algele albastre), şi acizii teichoici (polimeri de ribitol fosfat sau de glicerolfosfat), prezenţi numai la bacteriile Gram-pozitive.

După concepţia lui Weidel şi Pelzer (1964), sacul rigid reprezentat de structura de bază a peretelui celular al bacteriilor, numită de Salton *mucocomplex*, ar putea fi considerat ca o moleculă enormă menţinută într-o formă corespunzătoare fiecărei bacterii prin legături covalente multiple. Prin analogie cu denumirea de proteină, pentru această enormă macramoleculă saculiformă s-a propus denumirea de *mureină* (de la lat. murus = perete). Ea

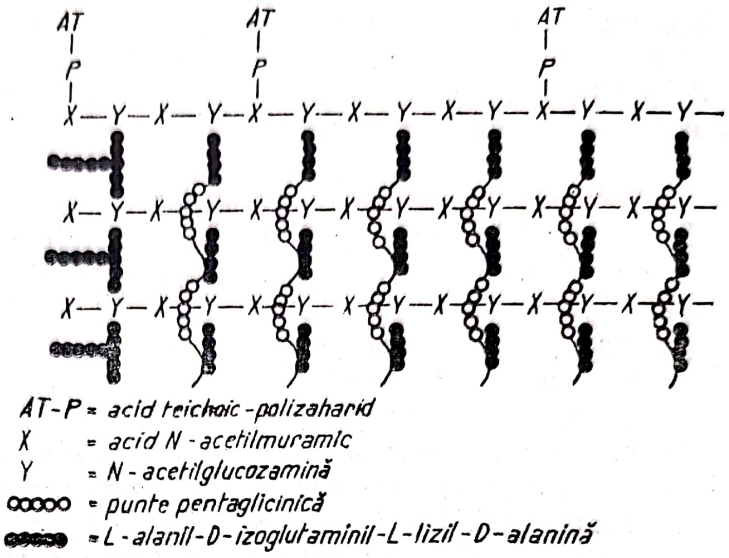


Fig. 102. Structura moleculară a peretelui celular la *Staphylococcus aureus*.

este alcătuită prin condensarea unor muropeptide în constituţia cărora intră acidul muramic, glucozamina, acidul diaminopimelic şi lizina, acidul *D*-glutamic, *L* şi *D*-alanina [1].

Semnificaţia biologică. Peretele celular are ca funcţie principală *susţinerea* mecanică a întregii arhitecturi celulare şi protejarea ei faţă de influenţele nefavorabile din mediu. Rigiditatea şi integritatea lui sînt condiţionate de structura stereochimică a mureinei. Exceptînd rolul său de susţinere şi protecţie a conţinutului celular, peretele bacterian nu pare să fie dotat cu nici o activitate vitală esenţială, aşa cum o dovedeşte faptul că el poate fi în întregime îndepărtat, fără ca prin aceasta activitatea metabolică, deci viaţa celulei, să fie compromisă, deşi celula rămasă viabilă devine mult mai vulnerabilă la acţiunea unor factori fizico-chimici ai mediului. Datorită rigidităţii sale, peretele celular asigură celulelor bacteriene forma lor caracteristică. Fără o structură parietală rigidă, bacteriile — care sînt supuse la acţiunea unor enorme forţe

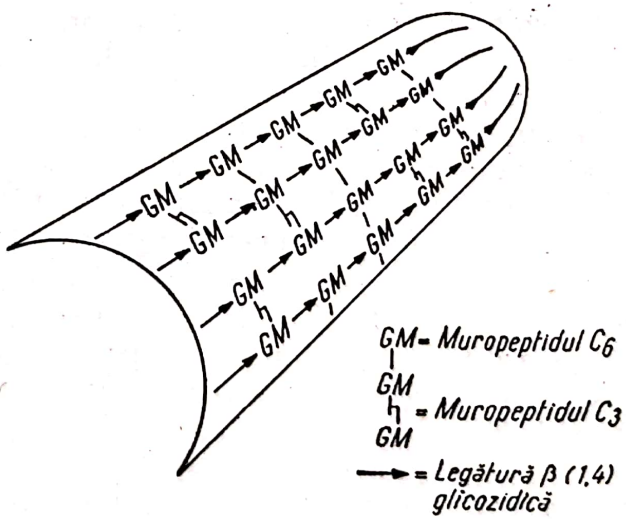


Fig. 103. Reprezentare schematică a unei porţiuni din sacul mureinic după modelul lui Weidel şi Pelzer. Reţeaua structurală poate fi închisă pe toate laturile de unde o configuraţie similară unui balon, forma ei depinzînd de aranjamentul lanţurilor şi de legăturile lor transversale.

[1] Prezenţa mureinei este importantă din punct de vedere taxonomic, deoarece ea este întîlnită numai la Procariote şi niciodată la Eucariote. Natura gucozamino-polipeptidică a peretelui celular pare a reprezenta un bun criteriu de încadrare a unui microorganism în grupul bacteriilor.

de suprafaţă — ar avea tendinţa să ia toate forma rotundă, care asigură cea mai mică suprafaţă posibilă în raport cu un volum dat. În plus, el asigură celulei bacteriene *elasticitatea* (respectiv capacitatea de a recăpăta forma şi dimensiunile iniţiale după modificări reversibile de volum determinate de creşterea presiunii lor de turgor sau de variaţii ale presiunii osmotice a mediului) şi ductibilitatea (rezistenţa la deformare).

Peretele celular are probabil şi un anumit rol în procesul de *adsorbţie* şi *fixare* a diferitelor substanţe la suprafaţa celulei înainte de pătrunderea lor în interior. Comparativ cu funcţia de adsorbţie selectivă şi de transport activ a membranei citoplasmatice, rolul lui de membrană semipermeabilă pare însă a fi cu totul minor. Peretele celular *participă la procesul de diviziune celulară*, urmînd membrana citoplasmatică în formarea septurilor transversale care, după replicarea cromozomului, separă celula-mamă în două celule fiice. În sfîrşit, unii constituenţi parietali ar imprima suprafeţei celulare o anumită specificitate, jucînd rolul de receptori pentru anumiţi bacteriofagi, determinînd fenomenul de „recunoaştere" a celulelor apte de conjugare, sau acţionînd ca factori antigenici, capabili să inducă în organismul animal infectat elaborarea de anticorpi specifici pentru care pot servi ca receptori celulari de suprafaţă.

b. Protoplaştii [1] şi sferoplaştii

Protoplastul reprezintă ansamblul structurilor celulare rămase din bacteria Gram-pozitivă, după îndepărtarea integrală a peretelui ei celular sub acţiunea lizozimului. Îmbrăcaţi în membrana citoplasmatică, protoplaştii se menţin în medii izotonice sau hipertonice ca formaţiuni sferice care păstrează în general proprietăţile şi activităţile vitale ale celulei din care provin, cum ar fi capacitatea respiratorie normală, sinteza de proteine şi acizi nucleici, viabilitatea în culturi şi, în anumite condiţii, chiar capacitatea de diviziune şi aptitudinea de a asigura multiplicarea fagului al cărui acid nucleic se găsea deja în celulă în momentul pierderii peretelui celular. Ei nu mai sînt însă capabili de a reface prin sinteză peretele celular dacă acesta a fost complet îndepărtat.

Funcţia de barieră osomtică, asigurată de membrana citoplasmatică, este însă mult mai labilă în lipsa protecţiei conferite de peretele celular rigid şi, ca urmare, în medii hipotonice protoplaştii se lizează. Este probabil ca formaţii similare să se găsească şi în condiţii naturale, la marginea coloniilor bătrîne, în lacuri şi alte ape, unde ar putea supravieţui, în anumite condiţii, cu toată fragilitatea lor. La bacteriile Gram-negative peretele celular nu poate fi degradat complet, astfel că tratarea cu lizozim îi slăbeşte numai structura

[1] A. F. Wyssling (1967) critică denumirea de *protoplast* consacrată prin uz în microbiologie, deoarece în sens biologic protoplastul reprezintă în general totalitatea constituenţilor celulei vii, indiferent dacă aceasta este sau nu acoperită de un perete. El preferă de aceea denumirea de *gimnoplast* folosită în botanică pentru a desemna protoplastul nud, în contrast cu dermatoplastul (celula vegetală normală cu perete celular), iar pentru sferoplaşti recomandă denumirea de *semigimnoplast*.

Scanned with OKEN Scanner

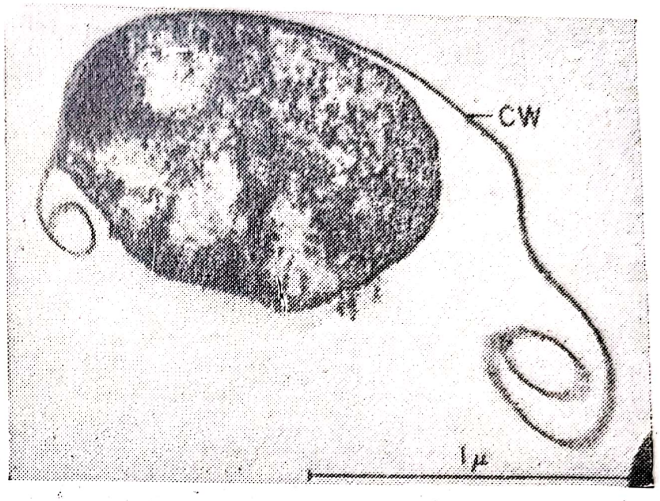


Fig. 104. Secţiune printr-un sferoplast *CW* — peretele celular parţial desprins de celula bacteriană.

prin degradarea selectivă a mucocomplexului. În medii hipotonice, celula astfel tratată se lizează, dar în medii hipertonice ea se transformă în *sferoplaşti*, corpi sferici echivalenţi unor protoplaşti înconjuraţi de acei constituenţi ai peretelui celular care au rezistat la acţiunea lizozimului.

c. Membrana citoplasmatică

Numită încă şi *membrană plasmatică*, această formaţiune structurală acoperă de jur împrejur citoplasma bacteriilor, separînd-o de suprafaţa internă a peretelui celular, de care ea însăşi este de obicei strîns alipită. Ea poate fi pusă în evidenţă şi la microscopul fotonic, fie după colorare selectivă cu albastru Victoria, fie chiar fără colorare la bacteriile vii, examinate în cîmp întunecat, în care caz apare ca o linie netă, luminoasă, strălucitoare. Masa ei reprezintă aproximativ 10—20% din greutatea uscată a celulelor.

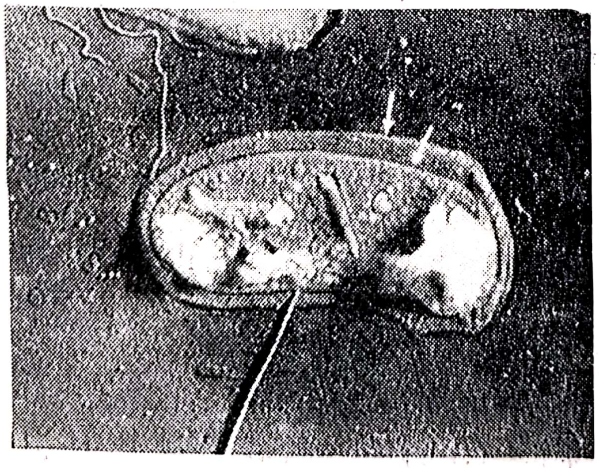


Fig. 105. *Vibrio cholerae* pe cale de autoliză. Săgeţile indică peretele celular (la exterior) şi membrana citoplasmatică (după Scanga).

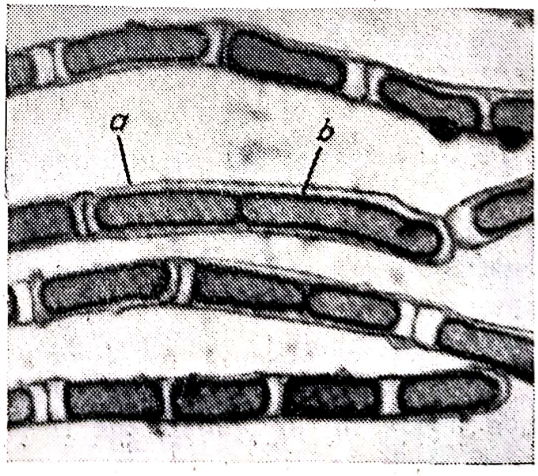


Fig. 106. Evidenţierea peretelui celular (*a*) şi a membranei citoplasmatice (*b*) la bacterii (după Mitchell).

Ultrastructura membranei citoplasmatice, studiată prin microscopie electronică la *E. coli*, este caracterizată prin tripla stratificare a acestei formaţiuni, care oferă un fel de imagine în oglindă a stratului *L* din structura peretelui celular. Cu o grosime similară cu a acestuia (50—55 Å) membrana citoplasmatică este formată din trei straturi, în mod obişnuit de grosime egală, cel intermediar fiind însă mai puţin opac faţă de electroni.

La bacteriile Gram-pozitive, membrana citoplasmatică are o grosime de circa 75 Å, şi este de asemenea stratificată. La *B. subtilis* ea este formată din două straturi mai dense — cel extern gros de 20—40 Å, iar cel intern mult mai subţire (15 Å) — separate de un altul mai puţin dens şi mai lat (50 Å); la *S. aureus* se disting în grosimea ei cinci straturi.

În membrana citoplasmatică se găsesc proteine (75%) şi lipide (20—30%) dispuse, după comparaţia lui Rogers ca un „sandviş" de lipide între două straturi de proteine.

Semnificaţie biologică. Membrana citoplasmatică este sediul structural al barierei osmotice de permeabilitate care reglează pătrunderea în celulă şi eliminarea selectivă a diferitelor substanţe. Ea menţine în celulă o concentraţie ridicată de macromolecule, molecule mici şi chiar ioni (K^+, Mg^{++}), împiedicîndu-le difuzarea în mediu deşi concentraţia lor extracelulară este mult mai mică. La nivelul său sînt localizate permeazele, enzime care asigură transportul activ în interiorul celulei al unor substanţe organice polare din mediu care formează cu permeazele complexe uşor disociabile.

Membrana citoplasmatică mai conţine şi numeroase enzime ale metabolismului respirator (citocromi, enzimele ciclului acizilor tricarboxilici etc.), ceea ce sugerează că ea ar avea şi o funcţie similară aceleia a mitocondriilor din celulele eucariote. În sfîrşit, membrana citoplasmatică are un rol important în coordonarea creşterii şi diviziunii celulare: la nivelul său ia naştere semnalul care declanşează iniţierea replicării cromozomului bacterian şi tot ea asigură segregarea celor doi cromozomi-fii prin formarea septului transversal care separă cele două celule-fiice.

d. Mezozomii

Descrişi iniţial sub denumirea de *corpi periferici* (Chapmann), mezozomii (Fitz-James, 1960), reprezintă un sistem membranos intracelular format prin invaginarea membranei citoplasmatice, de care de altfel rămîn legaţi în tot timpul vieţii celulei bacteriene. Unii autori au dat acestui sistem denumirea de *condrioid* (Van Iterson, 1965) sau de *membrane intracitoplasmatice* (Glauert, 1962).

Mezozomii apar ca pachete de membrane veziculare, lamelare sau tubulare, înconjurate de invaginări ale membranei citoplasmatice. Mezozomul şi veziculele derivate din el au toate caracteristicile membranei citoplasmatice legate de structura ei pluristratificată, de *„unit membrane"* (Robertson), şi o grosime globală de 75—80 Å. S-au descris trei tipuri de mezozomi: *lamelari*, formaţi prin plierea membranei invaginate într-un aranjament de spirală înco-

lăcită ca un ghem, *sacciformi*, care constau dintr-un grup de vezicule aproximativ sferice, şi *tubulari* de forma unor tubuşoare lungi.

Mezozomii sînt bine vizibili la bacteriile Gram-pozitive şi de aceea au şi fost descrişi iniţial la *B. subtilis* (Ryter), în timp ce la bacteriile Gram-negative ei sînt mai greu de observat, fiind în general mai rudimentari şi mai slab dezvoltaţi atît ca mărime cît şi ca număr. Originea lor este însă totdeauna aceeaşi, şi anume o invaginare urmată de creşterea membranei citoplasmatice.

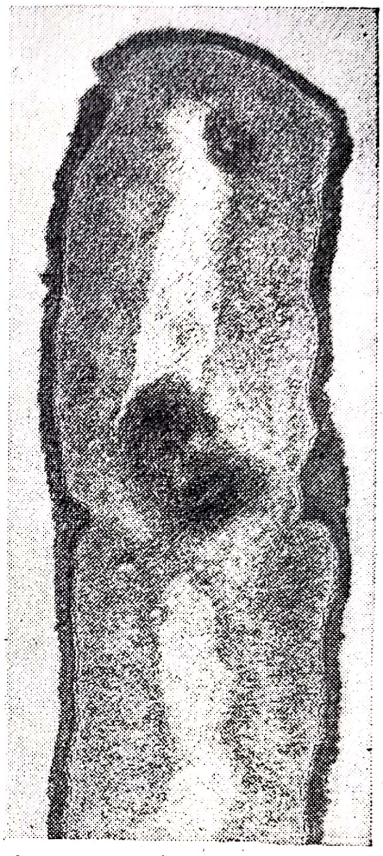


Fig. 107. Ultrastructura unei celule de *Bacillus subtilis*, evidenţiind un mezozom şi începutul invaginării membranei citoplasmatice (microelectronografie după Granboulan).

Semnificaţie biologică. În prezent nu se cunosc diferenţele precise de ordin chimic, biochimic şi funcţional dintre membranele plasmatice şi mezozomi, deşi unele date indică posibilitatea ca cele două formaţiuni atît de înrudite structural să aibă funcţii diferite în celulă. Organite derivate din membrana citoplasmatică, dar dotate cu o mare diversitate biochimică, mezozomii joacă, pe de o parte, rolul de centri ai sistemelor transportoare de electroni implicate în semipermeabilitatea acestei membrane, iar pe de altă parte, sînt legaţi de cromozomul bacterian (Ryter şi Jacob) a cărui replicare pare a fi iniţiată prin intermediul lor. Fixarea mezozomilor în acelaşi timp de materialul nuclear şi de membrana citoplasmatică favorizează realizarea unui mecanism adecvat de distribuire egală în cele două celule-fiice a genomurilor rezultate din replicarea cromozomului. Vecinătatea mezozomului faţă de septul parietal pe cale de creştere sugerează că el ar avea un rol important şi în formarea acestuia, asigurînd transportul precursorilor lui chimici din celulă spre zona de dezvoltare a septului transversal.

e. Citoplasma

Citoplasma bacteriană este în genere considerată ca un *sistem coloidal complex* format din proteine, glucide, lipide, apă şi substanţe minerale, sistem în care apa şi compuşii dizolvaţi în ea acţionează ca faza externă a unui sol (Lamanna). În citoplasmă coexistă însă stările fizice de coacervare, de emulsie şi de soluţie, astfel încît, de fapt, citoplasma bacteriană ar putea fi caracterizată ca un complex de stări fizice într-o continuă transformare, în funcţie de starea funcţională şi de vîrsta celulei.

Citoplasma bacteriană nu are o organizare structurală definită, similară citoplasmei din celula eucariotă vegetală sau animală, care conţine organite

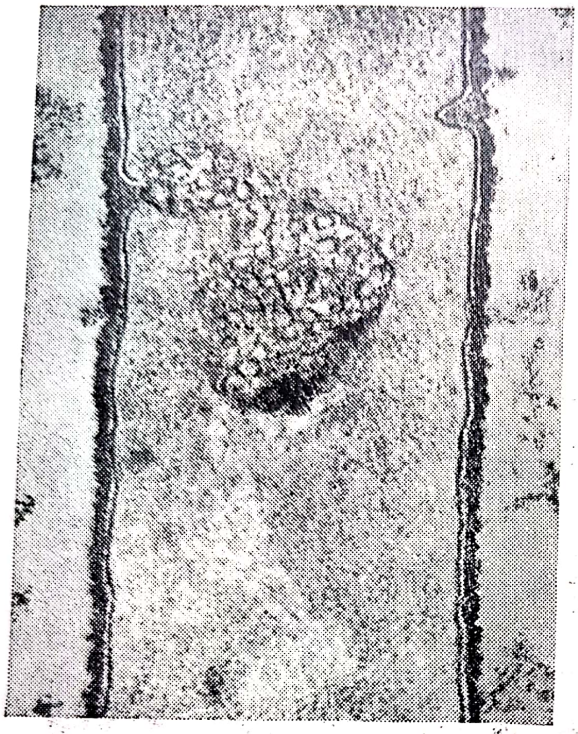


Fig. 108. Secţiune transversală prin mezozom la *Bacillus subtilis* evidenţiind legătura acestuia cu membrana citoplasmatică (după Van Iterson).

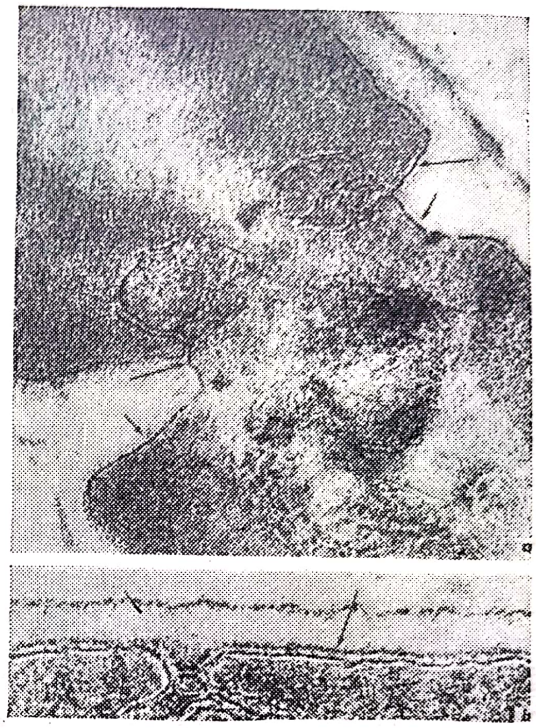


Fig. 109. Reprezentare de detaliu a procesului de formare a mezozomilor la *B. subtilis*. Se observă peretele celular şi spre interiorul celulei invaginarea membranei citoplasmatice cu formarea a doi mezozomi (*a*); acelaşi proces este evidenţiat cu ajutorul unei măriri mai puternice (*b*) (după Granboulan).

diferenţiate şi delimitate de membrane. Aspectul ei este variabil în funcţie de vîrsta culturii şi de condiţiile de mediu. La celulele tinere şi în condiţii normale de dezvoltare, citoplasma aderă de peretele celular şi se prezintă ca o masă densă, omogenă şi intens colorabilă. Pe microelectronografii ea apare alcătuită din granule atît de strîns grupate la un loc încît nu se pot diferenţia ca unităţi individuale şi de multe ori nu li se pot aprecia nici forma şi mărimea. Aceste granule sînt suspendate într-o matrice fără structură, care s-a dovedit a conţine în soluţie diferite săruri, substanţe organice, compuşi nutritivi pătrunşi în celulă prin difuziune din mediul ambiant şi substanţe de uzură gata de a fi eliminate în mediu. În masa granulară nediferenţiată se văd net granulaţii discrete cu diametrul de 150 Å, corespunzînd *ribozomilor*. La celulele bătrîne, pe măsură ce cultura se învecheşte, citoplasma îşi pierde treptat afinitatea tinctorială, se retractă centripet îndepărtîndu-se de perete şi capătă o structură granulară cu vacuole din ce în ce mai evidente la microscopul electronic.

Între particulele coloidale în suspensie şi lichidele intracelulare există o interdependenţă continuă şi un schimb permanent de diferiţi atomi şi molecule, o distribuţie variabilă de forţe electrice şi de atracţii chimice, şocuri

fizice reciproce etc., toate procesele intracitoplasmatice evoluînd într-o stare de echilibru relativ stabil unele faţă de altele. Rezultatul acestor interferenţe intracelulare, la care se adaugă acela al schimburilor bilaterale dintre celulă şi mediu, este viaţa celulei cu toate manifestările ei de metabolism, creştere şi multiplicare. În cursul lor, celula bacteriană îşi reînnoieşte permanent structura internă, transformînd prin degradare şi sinteză substanţele nutritive, difuzate din mediu, în structuri complexe specifice materiei vii.

O caracteristică a citoplasmei bacteriene este prezenţa unei mari cantităţi de acid ribonucleic (ARN), ceea ce explică bazofilia ei intensă, mai evidentă la celulele tinere. Celulele moarte se colorează mai puţin intens ca şi celulele bătrîne, la care sinteza ARN a încetat, iar cel existent este folosit ca sursă de N şi P.

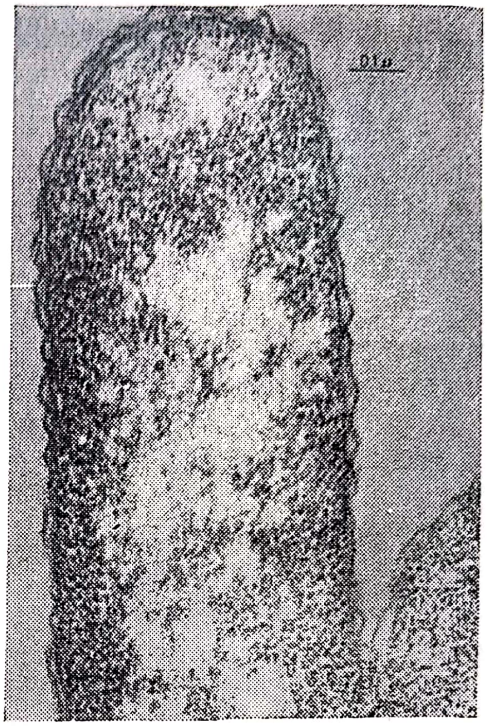


Fig. 110. Structura fină a citoplasmei la *E. coli* (după Van Iterson).

Datorită dimensiunilor mici ale bacteriilor şi suprafeţei lor mari de contact cu mediul, care nu fac necesare mijloacele speciale de transport al metaboliţilor apărute la organismele multicelulare în timpul evoluţiei (de exemplu, curenţii protoplasmatici, sistemele vasculare etc.), citoplasma bacteriană este lipsită de curenţi protoplasmatici. Ca urmare, pătrunderea şi răspîndirea substanţelor nutritive, ca şi eliminarea metaboliţilor, s-ar realiza în cazul celulelor bacteriene prin simplă difuziune.

Faptul că la examenul bacteriilor prin microscopie în contrast de fază au fost puse în evidenţă particule citoplasmice şi granulaţii în mişcare, arată că în celula bacteriană ar exista totuşi curenţi protoplasmatici, foarte slabi, care nu pot fi însă totdeauna observaţi din cauza volumului redus al celulei.

În interiorul citoplasmei se găsesc *materialul nuclear, incluziile, vacuolele, cromatoforii* şi ceilalţi constituenţi ai protoplastului.

f. Materialul nuclear

La celulele vegetale şi animale aparţinînd organismelor superioare (celule de tip eucariot), nucleul se prezintă ca o structură bine definită, mărginită de o membrană nucleară şi conţinînd un număr determinat de cromozomi capabili de diviziune mitotică, în cursul căreia se produc modificări caracteristice pentru evoluţia ciclului de diviziune. În celula bacteriană „nucleul" este o structură plastică, lipsită de membrană nucleară (structură procariotă), situată în mod obişnuit în partea centrală a celulei bacteriene şi care nu suferă modificări

de tip mitotic în cursul ciclului de diviziune. Datorită caracterelor particulare ale acestei structuri, în locul denumirii de nucleu bacterian se folosește, de preferință, pentru desemnarea ei, termenul de *nucleoid, material nuclear* sau *corp cromatinic*.

Studiul nucleoidului la microscopul fotonic s-a lovit de dificultăți legate nu atît de micimea celulei bacteriene, cît mai ales de bazofilia intensă a citoplasmei, foarte bogată în ARN, care nu a permis diferențierea cu coloranți bazici a materialului nuclear constituit din ADN, la fel de bazofil. Datorită acestui fapt, evidențierea corpului cromatinic bacterian la microscopul fotonic nu se poate face prin colorare selectivă decît după îndepărtarea ARN citoplasmatic realizată prin hidroliză acidă (tehnica Robinow și Feulgen) sau enzimatică (tehnica Boivin, cu ribonuclează). Cu aceste tehnici, materialul nuclear apare sub diferite forme, ca acelea de granule sferice sau ovalare, halteră, bastonașe izolate sau dispuse în *V*, filament axial etc., reprezentînd 5—16% din volumul celulei.

Pe micrografiile electronice, materialul nuclear este localizat în mod obișnuit în partea centrală a celulei. El se prezintă ca o zonă mai clară, cu o densitate medie mai mică decît aceea a citoplasmei înconjurătoare, astfel că la

Fig. 111. Structura fibrilară a materialului nuclear la *Agrobacterium tumefaciens* (după Ryter).

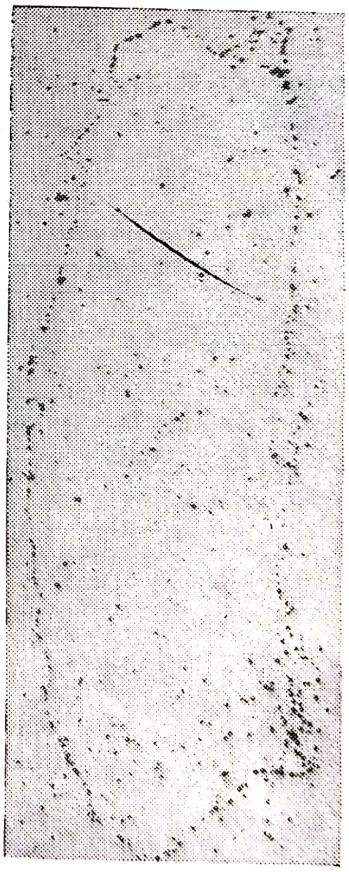


Fig. 112. Autoradiografia unui cromozom de *E. coli* marcat cu timidină tritiată.

bacterii contrastul dintre structurile intracelulare este inversat în raport cu acela caracteristic celorlalte celule, la care nucleul este, dimpotrivă, mai dens decît citoplasma. Acest aspect specific al imaginii electronografice a nucleoidului este determinat nu de vreo particularitate a materialului nuclear, ci de densitatea neobişnuit de mare a citoplasmei bacteriene. Pe secţiuni ultrafine s-a observat că regiunea nucleară este plină cu fibrile fine cu Ø între 20 şi 50 Å, uneori aranjate în şiruri ondulate, paralele, care seamănă cu o jurubiţă de aţă cîteodată răsucită, care dispar după digestia cu dezoxiribonuclează, ceea ce arată că ele sînt formate din ADN şi corespund cromozomului bacterian. Extras cu metode speciale, cromozomul bacterian — denumit şi *lineom, nucleosom* sau *genofor* — s-a dovedit a fi alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN, de formă circulară (extremităţile ei nefiind libere, ci reunite), cu o lungime de 1 400 μ şi un Ø de 25 Å, corespunzînd diametrului moleculei de ADN dublu catenar. În prezent nu se cunoaşte modul în care această moleculă imensă este „împachetată" pentru a forma un corp cromatinic compact cu dimensiuni de 1 500 de ori mai mici decît propria sa dimensiune în stare desfăşurată.

În mod normal, bacteriile aflate în faza de repaus în culturi staţionare şi vechi au un singur cromozom, astfel că sînt uninucleate. În faza de creştere activă, în culturi tinere pe medii optime, ele apar însă ca multinucleate, avînd 2—4 cromozomi, care sînt însă genetic identici, deoarece provin prin replicare dintr-un singur cromozom parental. De aceea, indiferent de aspectul morfologic al materialului lor nuclear, din punct de vedere genetic bacteriile sînt organisme esenţialmente haploide, astfel încît chiar atunci cînd celula bacteriană primeşte un aport de material nuclear exogen — prin procese de transfer genetic — diploidia ei nu este decît parţială şi tranzitorie.

Apariţia bacteriilor multinucleate este în mod obişnuit rezultatul unei lipse de sincronizare între ritmul de creştere şi ritmul de diviziune celulară. Cînd celula este în stare de repaus, viteza de replicare a materialului nuclear este proporţională cu viteza de creştere a celulei.

În culturi tinere, ca şi pe medii de cultură optime, replicarea ADN este accelerată astfel că nucleoidul se poate multiplica de mai multe ori, înainte ca diviziunea celulară să fi avut timpul să se desăvîrşească. Bacteriile multinucleate apar şi sub influenţa unor condiţii de mediu care interferă nu cu diviziunea nucleară, ci cu aceea a celulei. Astfel, sub acţiunea penicilinei care blochează

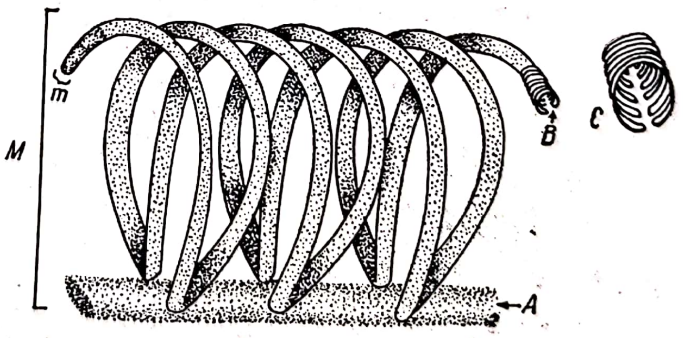


Fig. 113. Reprezentare schematică a unui cromozom bacterian evidenţiind posibilitatea de aranjare spaţială a moleculei ADN, care-i permite să ocupe în celulă un spaţiu foarte mic în raport cu lungimea ei (după Giesbrecht).

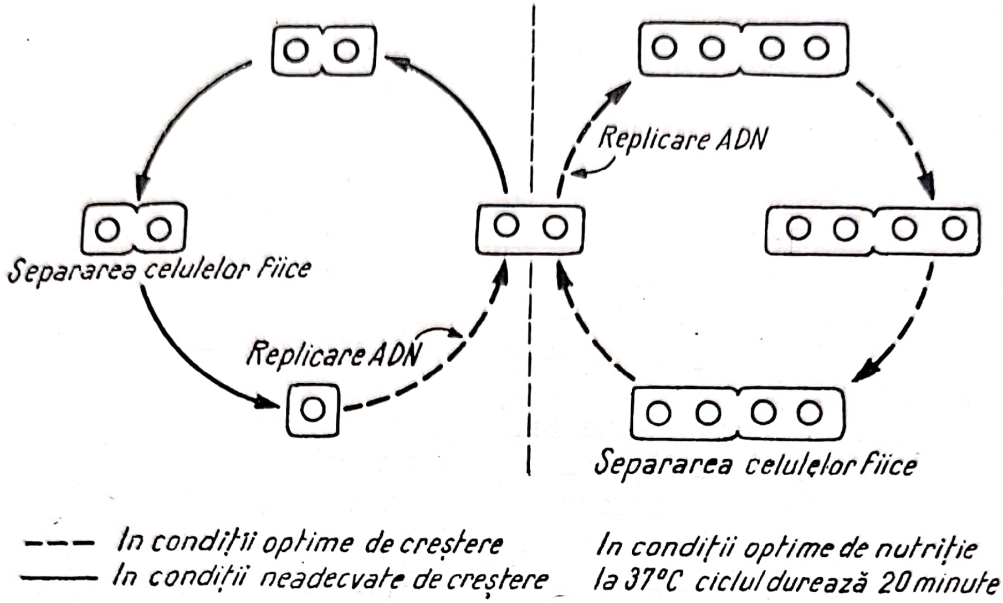


Fig. 114. Structura materialului nuclear la *E. coli*. În condiţii optime de creştere, fiecare bacterie conţine 2—4 cromozomi genetic identici; în condiţii de mediu neadecvate, celula bacteriană are un singur cromozom.

sinteza componentei muraminice a peretelui celular, acesta nu mai poate participa la formarea septurilor transversale de diviziune, astfel încît apar celule filamentoase sau globuloase, cu mai mulţi „nuclei".

g. Ribosomii

Ribosomii sînt *formaţiuni citoplasmatice* de formă aproximativ sferică, avînd un diametru variabil cuprins între 70 şi 200 Å şi care pot fi caracterizate după viteza lor de sedimentare la ultracentrifugă, apreciată în unităţi Svedberg (notate cu litera *S*). La organismele superioare, ei au o constantă

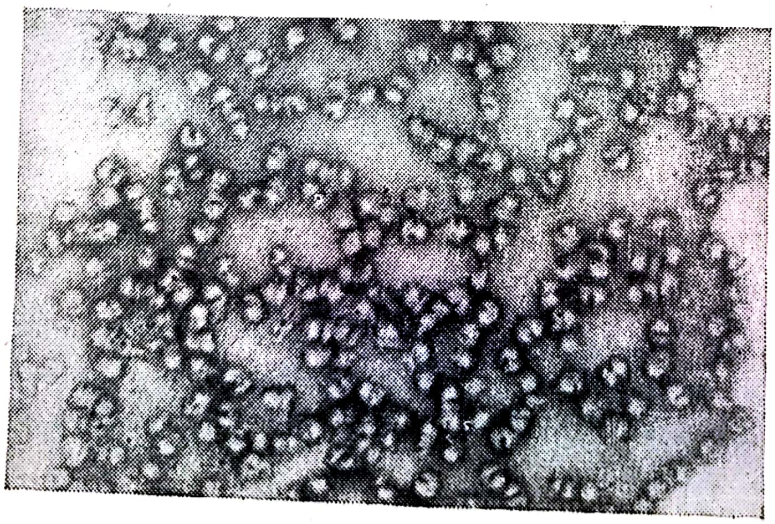


Fig. 115. Ribosomii bacterieni: fiecare ribosom 70*S* este alcătuit din două porţiuni inegale: 50*S* şi 30*S*, cu contur circumferenţial (microelectrografie după Huxley şi Zubay).

de sedimentare de 70-*S* şi sînt grupaţi într-un şir liniar cu aspect membranos numit *reticul endoplasmic*. La bacteria *E. coli*, în faza de creştere activă se găsesc circa 15 000 particule ribozomale libere în citoplasmă, avînd în general o constantă de sedimentare de 70 *S*, dar prezentînd tendinţa de a se disocia rapid în unităţi mai mici, de tipurile 50 *S* şi 30 *S*. Mărimea şi stabilitatea ribozomilor de acest tip s-au dovedit a fi în funcţie de concentraţia ionilor Mg^{++} şi K^{+}.

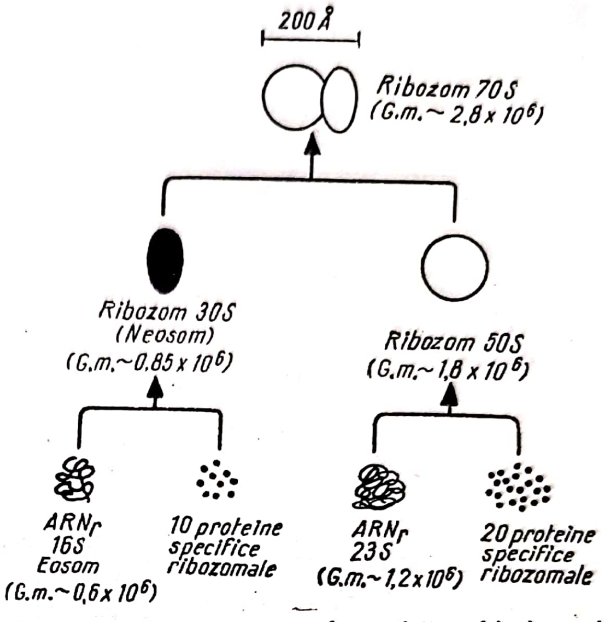


Fig. 116. Reprezentare schematică a biosintezei ribosomilor 70*S* la *E. coli*.

Formarea ribosomilor bacterieni a fost studiată de R o b e r t s (1963) la *E. coli*. Moleculele de ARN ribozomal de tipurile 16 *S* şi 23 *S* (eosomi) se combină cu proteina ribozomală pentru a forma neosomii — complexe ARN — proteină cu constanta de sedimentare < 30 *S*, care prin adiţie de proteine (în total 10—20 de molecule) formează în continuare, ribozomii cu constante de sedimentare de 30 *S* şi respectiv 50 *S*. La concentraţia de Mg^{++} prezentă în mod normal în celula bacteriană, 70—90% din subunităţile 30 *S* şi 50 *S* sînt agregate două cîte două — cîte una din fiecare tip — în unităţi 70 *S* printr-un proces care este reversibil, deoarece scăderea concentraţiei Mg^{++} antrenează desfacerea ribozomilor în unităţile lor constitutive 30 *S* şi 50 *S*. La rîndul lor, în prezenţa unor concentraţii uşor mărite de Mg^{++}, doi ribosomi 70 *S* se pot grupa pentru a forma un ribosom 100 *S*.

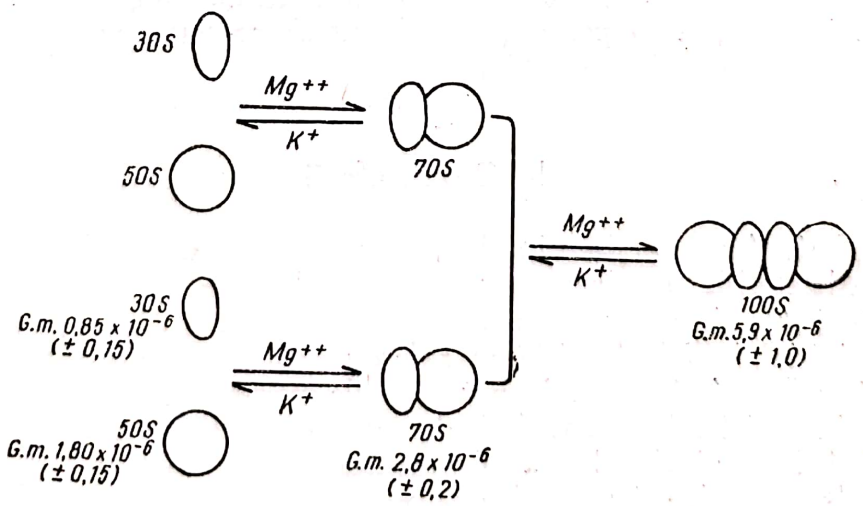


Fig. 117. Reprezentare schematică a procesului de agregare reversibilă a ribosomilor de *E. coli* sub influenţa ionilor de Mg++.

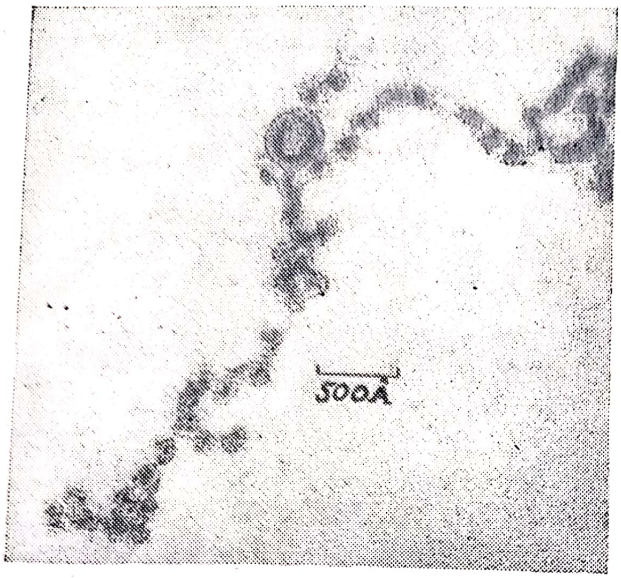


Fig. 118. Polisomi de *E. coli* (microelectronografie după Rich).

Studiile privind structura chimică a ribosomilor au arătat că ea constă în proporţie de 65% dintr-un tip special de ARN (ARN ribozomal, notat ARN*r*), restul de 35% fiind reprezentat de proteine cu greutate moleculară 30 000. Ribozomii 30 *S* conţin un singur tip de ARN*r* (16 *S*), în timp ce ribozomii 50 *S* conţin două tipuri diferite de ARN*r* (23 *S* şi 5 *S*).

Semnificaţie biologică. Ribosomii din clasa 70 *S* au un rol esenţial în procesul de biosinteză a proteinelor celulare datorită capacităţii lor de a fixa ARN mesager (ARN*m*), care asigură aranjarea specifică a aminoacizilor în lanţul polipeptidic. De aceea, ei sînt consideraţi ca adevărate „fabrici" de proteine celulare. În cursul procesului de biosinteză a proteinelor, ribosomii individuali de 50—100 Å au tendinţa de a se grupa în grămezi de 4—10—55 elemente individuale pentru a forma *polisomi* sau *ergosomi* (poliribosomi). La *B. megaterium* şi *B. cereus*, polisomii — lungi de 150—850 Å — se asociază cu structuri membranoase şi uneori sînt ataşaţi de membrana citoplasmatică. Mărimea polisomilor este influenţată atît de lungimea moleculei de ARN*m* pe care o fixează în cursul sintezei proteice, cît şi de structura membranei care le serveşte ca suport.

Aspectul microelectronografic al polisomilor sugerează o anumită ordine liniară de aranjare a ribozomilor individuali, astfel încît este probabil ca în celula bacteriană vie, aceştia să fie dispuşi mai curînd liniar decît în grămezi.

Polisomii acţionează în procesul de biosinteză proteică cu o eficienţă mult mai mare decît ribozomii individuali.

h. Cromatoforii

Cromatoforii sînt organite citoplasmatice specializate ca *centre fotochimice* prezente la bacteriile fotosintetizante purpurii, la care pot ajunge să constituie pînă la 40—50% din greutatea uscată a celulei.

Descrişi iniţial la *Rhodospirillum rubrum* sub forma unor structuri sferice cu Ø 5—600 Å, avînd aspectul unor vezicule mărginite de o membrană, ei au fost denumiţi mai întîi cromatofori, de către P a r d e e şi colaboratorii, datorită localizării la nivelul lor a pigmenţilor fotosintetizanţi, iar ulterior au primit de la M e n k e (1962) denumirea de thylakoizi, datorită formei lor de pungă (de la gr. *thulakos*=pungă). Abundenţa acestor structuri în citoplasmă este în relaţie inversă cu intensitatea luminii şi în relaţie directă cu

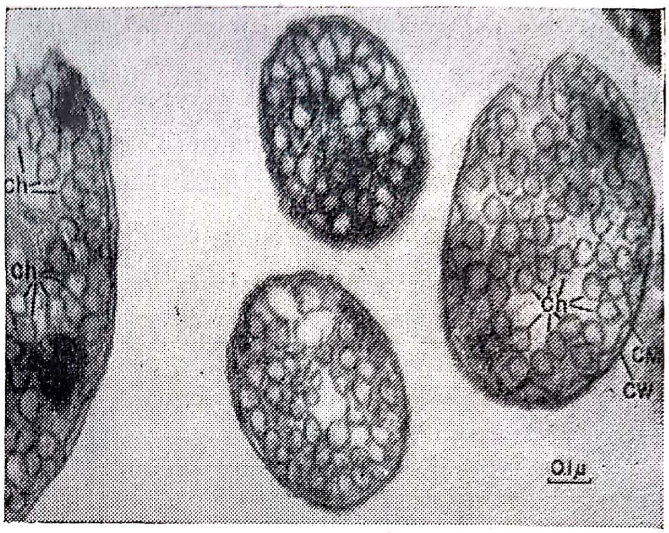


Fig. 119. Secţiune prin *Rhodospirillum rubrum*: *ch* — cromatofori; *CW* — peretele celular; *CM* — membrana citoplasmatică.

conţinutul celulei în bacterioclorofilă [1]. Cînd conţinutul total în clorofilă este mic, veziculele care o poartă sînt localizate exclusiv la periferia celulei. Pe măsură ce cantitatea acestui pigment creşte, veziculele se înmulţesc în profunzimea citoplasmei, către interiorul celulei. Ele sînt absente în celulele care cresc aerob la întuneric, în lipsa condiţiilor pentru fotosinteză. În afară de pigmenţii fotosintetizanţi (bacterioclorofile şi carotenoizi), cromatoforii mai conţin proteine, lipide şi sisteme enzimatice, precum şi transportori de electroni care intervin în fosforilarea fotosintetică (fotofosforilare). Datele de microscopie electronică pledează pentru ipoteza că la bacteriile fotosintetizante purpurii, cromatoforii sînt structuri derivate din membrana citoplasmatică.

La bacteriile fotosintetizante verzi din genul *Chlorobium*, aparatul fotosintetizant este reprezentat de un sistem de vezicule mari, alungite, dispuse izolat într-o zonă corticală. Aceste formaţiuni, denumite *vezicule de Chlorobium*, cu dimensiuni cuprinse între 300—400×1 000—1 500 Å şi mărginite de o membrană, sînt localizate între membrana citoplasmatică şi stratul ribozomal. Cercetările efectuate pe extracte acelulare au arătat că sistemul de pigmenţi fotosintetizanţi (din grupul chlorobiumclorofilelor) este localizat în cea mai mare parte, dacă nu chiar integral, la nivelul acestor structuri.

i. Sporul

Sporul este o formaţie endocelulară care apare în anumite condiţii de viaţă la unele bacterii şi care este capabilă să păstreze multă vreme în stare latentă toate caracterele genotipice ale formei vegetative din care provine.

Sporogeneza este excepţională la coci *(Sporosarcina ureae)* dar reprezintă un caracter de specie, cu valoare taxonomică importantă, la bacteriile cilindrice din familia *Bacillaceae;* sporul apare ca o structură constantă la bacteriile anaerobe aparţinînd genului *Clostridium* şi în mod facultativ la bacteriile aerobe din această familie grupate în genul *Bacillus*.

[1] După datele lui Cohen-Bazire, creşterea intensităţii luminoase este însoţită de o scădere a cantităţii de clorofilă din celulă, cantitate care este însă maximă pentru o intensitate luminoasă cu mult inferioară aceleia care asigură creşterea cu viteză maximă a celulei.

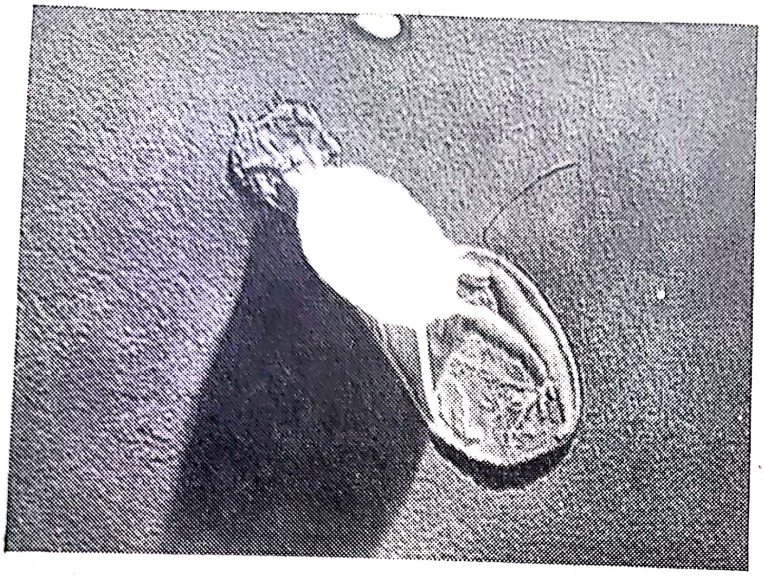


Fig. 120. Spor bacterian inclus într-un sporange (microelectronografie după Scanga).

După modul de formare, structura şi rezistenţa lor, sporii bacterieni se pot grupa în patru tipuri întrucîtva diferite:

1) *Sporul propriu-zis* sau *endosporul* — forma cea mai caracteristică pentru bacterii — este o formaţie intracelulară foarte refringentă, dotată cu mare rezistenţă la condiţii defavorabile, care apare în interiorul unei celule vegetative numită s p o r a n g i u.

2) *Artrosporul* se formează la bacterii prin fragmentarea unor celule vegetative care devin din ce în ce mai mari. El are o formă mai neregulată şi o rezistenţă intermediară între aceea a endosporului şi cea a formei vegetative. Acest tip de spor a fost descris la *Bacillus megaterium* şi *B. zopfii*; trebuie deosebit de formaţia cu acelaşi nume rezultată în urma dezarticulării hifelor unui miceliu septat la fungi.

3) *Microchistul* (chlamidosporul), descris la *Azotobacter chroococcum*, este o formă de rezistenţă care provine din transformarea unei celule vegetative, în întregul ei, prin îngroşarea pereţilor şi acumularea de material de rezervă. El are o rezistenţă mai mică decît aceea a endosporului.

4) *Gonidia* (*gonidia* = sămînţă) este o structură descrisă da bacteria *Leptothrix ochracea* la care apare endocelular prin contracţia, condensarea şi fragmentarea protoplasmei unei celule vegetative numite *gonidangiu*. În interiorul unei celule pot apărea mai multe gonidii, care se liberează în mediu, după ruperea peretelui gonidangiului. Principala lor funcţie priveşte capacitatea de reproducere. Gonidiile nu au rezistenţa caracteristică sporilor. Semnificaţia lor este încă discutată.

Morfologie: Sporul tipic bacterian (endosporul), este o formaţie sferică sau ovalară, refringentă, cu dimensiuni variabile după specie şi, în cadrul aceleiaşi specii, în funcţie de vîrsta culturii şi de condiţiile ei de mediu. La unele specii, diametrul sporului poate depăşi diametrul transvers al celulei, ceea ce determină deformarea acesteia. În medie, el are dimensiuni cuprinse între 0,5 şi $0{,}9\mu \times 1$ şi $1{,}5\,\mu$ şi un volum mediu de $0{,}448—1{,}744\,\mu^3$, ceea ce reprezintă aproximativ 1/7—1/17 din volumul şi 1/3 din greutatea celulei-sporange.

Aşezarea lui în celulă, variabilă la unele specii, este constantă la altele, constituind un criteriu taxonomic; ea poate fi ecuatorială (centrală) ca la B. *anthracis*, subterminală (*B. cereus*, *B. asterosporus*) sau terminală (*Clostridium tetani*, *C. felsineum*).

Sporul bacterian este în marea majoritate a cazurilor unic într-un sporangiu. Excepţional s-au descris bacterii cu doi sau mai mulţi spori (de exemplu, *Metabacterium polyspora, B. bütschlii* şi unele bacterii care participă la topitul plantelor textile din ţara noastră). Această situaţie particulară poate fi datorată unei diviziuni celulare incomplete, în sensul că celula sporogenă s-a divizat, dar nu s-a produs şi separarea celor două celule-fiice. Deci sporangiul disporic ar fi echivalent cu două sporangii monosporice încă neseparate. Aceasta ar explica şi existenţa unor celule filamentoase cu mai mulţi spori.

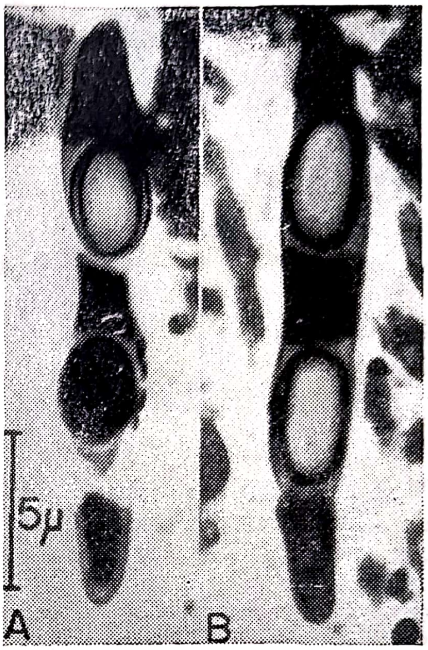


Fig. 121. *A, B:* celule bacteriene bisporulate izolate de la mormoloci de *Rana pipiens* (după Robinow).

Metoda de evidenţiere. Datorită slabei permeabilităţi a învelişului lor extern, densităţii mari a conţinutului lor şi unei slabe afinităţi pentru coloranţi, sporii nu se colorează cu metodele uzuale sau se colorează numai în contur. Ei rămîn incolori şi refringenţi în contrast cu restul formei vegetative care se colorează. Sporul poate fi însă colorat — apărînd ca un coc sferic sau ovalar omogen — cu ajutorul coloranţilor energici, după permeabilizarea la cald a pereţilor săi. În celulele vii examinate în preparate umede, între lamă şi lamelă, sporul se observă ca o formaţie refringentă net distinctă în citoplasma granulară.

Ultrastructură. Sporii diferitelor specii de bacterii — aparent omogeni şi similari la microscopul fotonic — se prezintă pe microelectronografii cu o structură internă asemănătoare, dar cu grade diferite de organizare a învelişului lor extern. Învelişul sporal are totdeauna o structură lamelară complexă, fiind alcătuit din trei straturi principale suprapuse — un strat extern de înveliş (exina), unul mijlociu şi unul intern (intina), dar la unele specii fiecare dintre aceste straturi este, la rîndul său, pluristratificat. Sub învelişul sporal se observă o zonă transparentă mai puţin densă — *cortexul* — dincolo de care se găseşte „sîmburele" sporului sau celula sporală propriu-zisă, acoperită de un perete. Sporul propriu-zis, „sîmburele", este alcătuit dintr-o citoplasmă granulară — *sporoplasma* — care conţine particule de circa 100 Å corespunzînd probabil ribozomilor şi din materialul nuclear alcătuind *nucleoplasma.*

La unele bacterii (*B. cereus, B. anthracis*), în jurul învelişului sporal poate exista un *exosporium,* probabil rămăşiţă a peretelui celulei vegetative, care înfăşoară sporul ovalar într-un înveliş subţire de-a lungul marginilor longitudinale şi mult bombat la extremităţi.

Unii spori sînt prevăzuţi la una dintre extremităţi cu un smoc de apendici, similari unor panglici, iniţial spiralaţi apoi rectilinii, orientaţi paralel, cu o lungime de 2—3 ori mai mare decît lungimea sporului. Aceşti apendici au aspectul unui tub turtit sau uneori al unei pene de pasăre, fiind alcătuiţi

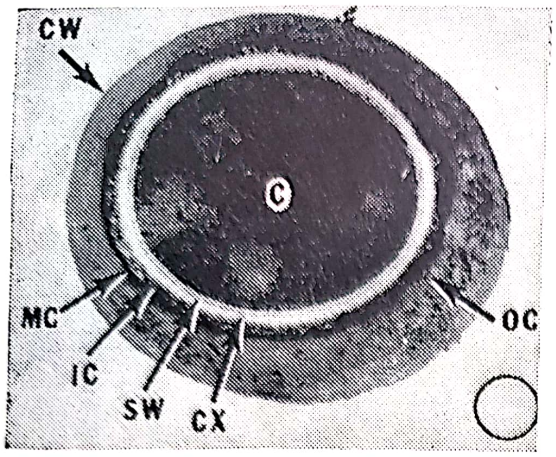


Fig. 122. Secţiune printr-un sporangiu de *Clostridium* sp. evidenţiind peretele său celular (*CW*), învelişurile sporale extern (*OC*), intermediar (*MC*) şi intern (*IC*), cortexul (*CX*) şi corpul central sau „sîmburele" sporului (*C*) acoperit de peretele sporal (după Rode).

dintr-o structură centrală, ca un fel de tijă, de la care pornesc nenumărate filamente cu o lungime egală. Ei iau naştere treptat în cursul sporogenezei, ajungînd la un moment dat să umple tot spaţiul din sporange care a rămas neocupat de spor. Apendicii sporali au o structură multistratificată; una dintre suprafeţele lor este netedă, iar cealaltă are numeroase neregularităţi care îi dau un aspect striat. Semnificaţia lor biologică este nelămurită: ei ar fi organite care favorizează diseminarea sporilor în natură, ar ajuta nutriţia sporului în cursul formării sale sau ar fi lipsiţi de semnificaţie funcţională, rezultînd numai dintr-o alterare metabolică.

Compoziţia chimică. În afara constituenţilor normali ai celulei vegetative, sporul mai conţine şi o substanţă specifică — acidul dipicolinic, prezent sub formă de sare de Ca — care reprezintă 5—10% din greutatea lui uscată. De asemenea, el este mai bogat în Ca şi Mg şi mai sărac în K şi P decît celula vegetativă.

Iniţial, se considera că sporul ia naştere prin deshidratarea formei vegetative, ceea ce explică lipsa metabolismului şi termorezistenţa lui. În realitate, diferenţa dintre spor şi celula vegetativă în ceea ce priveşte conţinutul în apă nu este de ordin cantitativ, ci de ordin calitativ, în sensul că la spori numai o mică parte din apă este în stare liberă, restul fiind „legată" de constituenţii celulari.

TABELUL 7

CONŢINUTUL ÎN APĂ LIBERĂ AL CELULEI VEGETATIVE ŞI AL SPORULUI
(după Friedman şi Henry)

Microorganismul	Apă liberă, în %	
	Celula vegetativă	Sporul
B. subtilis	68,9	3,4
B. megaterium	60,2	4,5
B. mycoides	50,0	11,9

Conţinutul în enzime al sporului este mult mai mic decît acela al formei vegetative şi, în plus, acestea sînt în stare inactivă. De aceea, sporul este practic lipsit de activitate metabolică. Deşi prin metodele moderne s-a observat totuşi prezenţa unei activităţi metabolice reduse şi a unui slab consum de oxigen, acestea ar putea fi datorate activităţii unor enzime adsorbite pe suprafaţa sporului sau unei germinări incipiente.

Scanned with OKEN Scanner

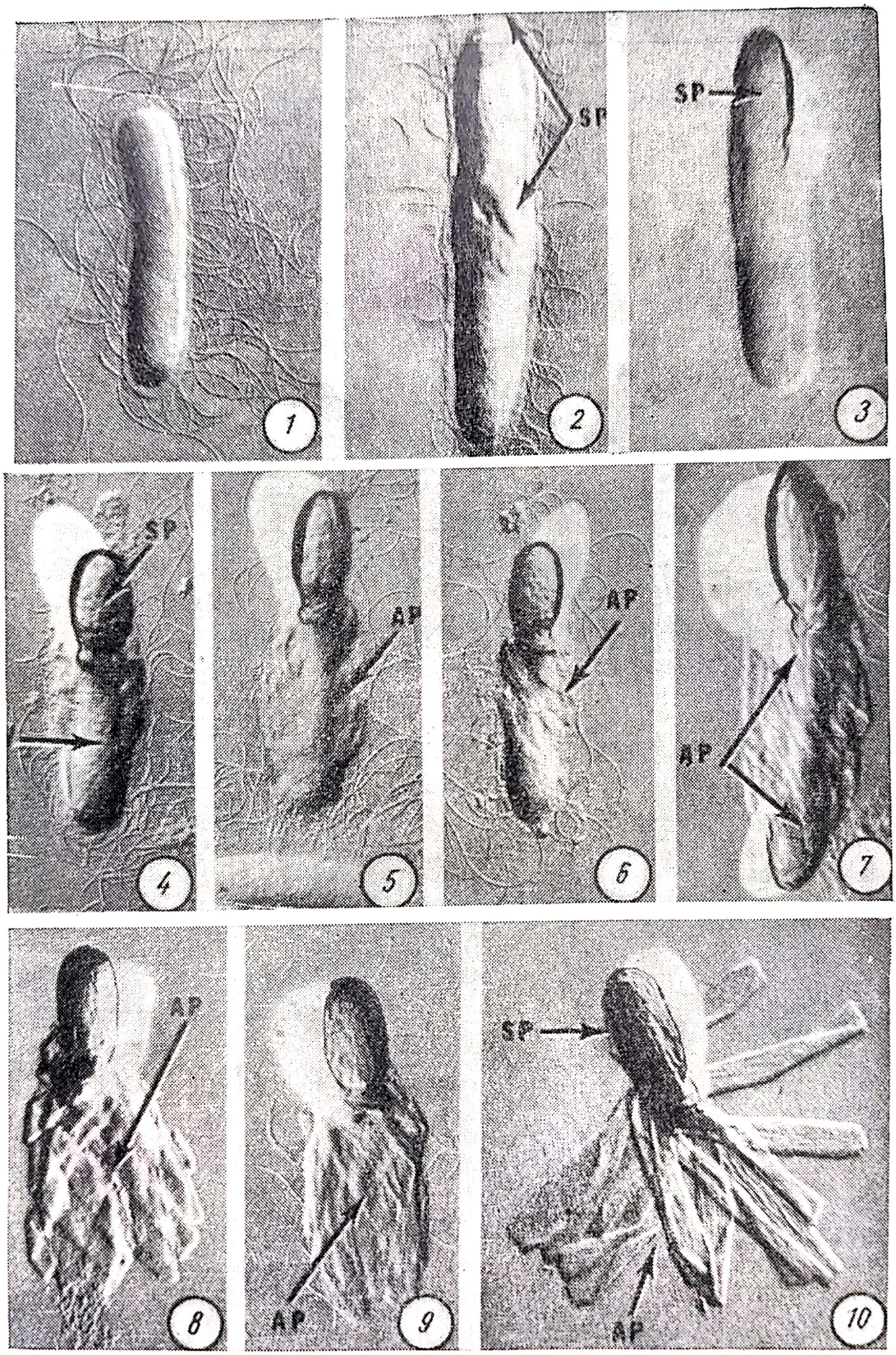


Fig. 123. Etapele succesive în formarea unui spor la *Clostridium* sp. (după Rode): *1* — celula vegetativă peritrihă; *2* — începutul formării sporului (*SP*); *3* — sporange cu spor în curs de maturare; *4* — spor liber, celulă vegetativă (*V*) în curs de liză şi dezintegrare; *5, 6* — apariţia apendicelor sporale; *7* — spor liber cu apendice spiralate; *8, 9, 10* — etape succesive în formarea apendicelor sporale şi dispariţia celulei vegetative.

Scanned with OKEN Scanner

Citologia formării şi germinaţiei sporului. Sporogeneza este un proces de formare în interiorul celulei bacteriene a unei celule de tip nou, diferită din punct de vedere chimic, enzimatic şi fiziologic. Acest proces evoluează, după Knaysi, în trei faze succesive: *a*) *stadiul preparator*, *b*) *stadiul de prespor* şi *c*) *stadiul de maturare*. Formarea presporului este precedată de o replicare şi o reorganizare nucleară, cu trecerea unui cromozom în spor, celălalt rămînînd în celula vegetativă. Regiunea din celulă unde va apărea sporul îşi măreşte opacitatea la lumină şi la electroni, iar în interiorul ei apare o formaţie refringentă, în jurul căreia se condensează o membrană periferică din care se vor forma învelişurile sporale. Către sfîrşitul perioadei de sporulare, sporangiul suferă modificări, care pot avea un caracter relativ limitat, în care caz sporul rămîne fixat în sporangiu dar pot fi şi profunde, putînd să ducă la dezintegrarea lui completă, cu eliberarea consecutivă a sporului. Trecerea de la starea criptobiotică, de viaţă latentă în stadiul de spor, la starea vegetativă, de viaţă activă în stadiu celular, se realizează în trei faze succesive: *a*) *faza de activare*, caracterizată prin modificări în structura macromoleculară, însoţite de uşoare modificări structurale; *b*) *faza de germinare*, în care are loc

Fig. 124. Spor de *Bacillus megaterium* pe cale de germinare. Se observă începutul dezintegrării învelişurilor sporale şi formarea peretelui celular (*CW*), a citoplasmei, mezozomilor, a ribozomilor şi a unui material nuclear bine diferenţiat, caracteristic celulei vegetative (după Robinow).

Fig. 125. Secţiune printr-o celulă tînără de *Bacillus subtilis* pe cale de a părăsi învelişul sporal după germinare.

Scanned with OKEN Scanner

degradarea macromoleculelor şi excreţia în mediu a unor substanţe tipice pentru spor — acid dipicolinic, calciu, unele peptide — precum şi umflarea sporului care îşi pierde refringenţa şi termorezistenţa, umple complet exosporiul şi devine treptat metabolic activ; c) *faza de creştere*, în care se produc ruperea învelişului sporal şi ieşirea din el a noii celule de care uneori rămîne multă vreme ataşat fostul înveliş sporal.

Semnificaţia biologică. Spre deosebire de concepţiile clasice, după care sporii se constituie ca o formă de adaptare, ori de cîte ori celula vegetativă întîlneşte condiţii defavorabile de viaţă (hrană insuficientă, uscăciune, acumulare de cataboliţi etc.) în concepţia modernă stadiul de spor corespunde unei etape fiziologice normale din evoluţia celulei bacteriene aparţinînd unei specii sporogene. Dovada o constituie faptul că sporogeneza necesită condiţii de mediu foarte similare celor obişnuite pentru celula vegetativă, uneori chiar cu limite de variaţie mai mici decît cele tolerate de celula vegetativă, procesul de spo-

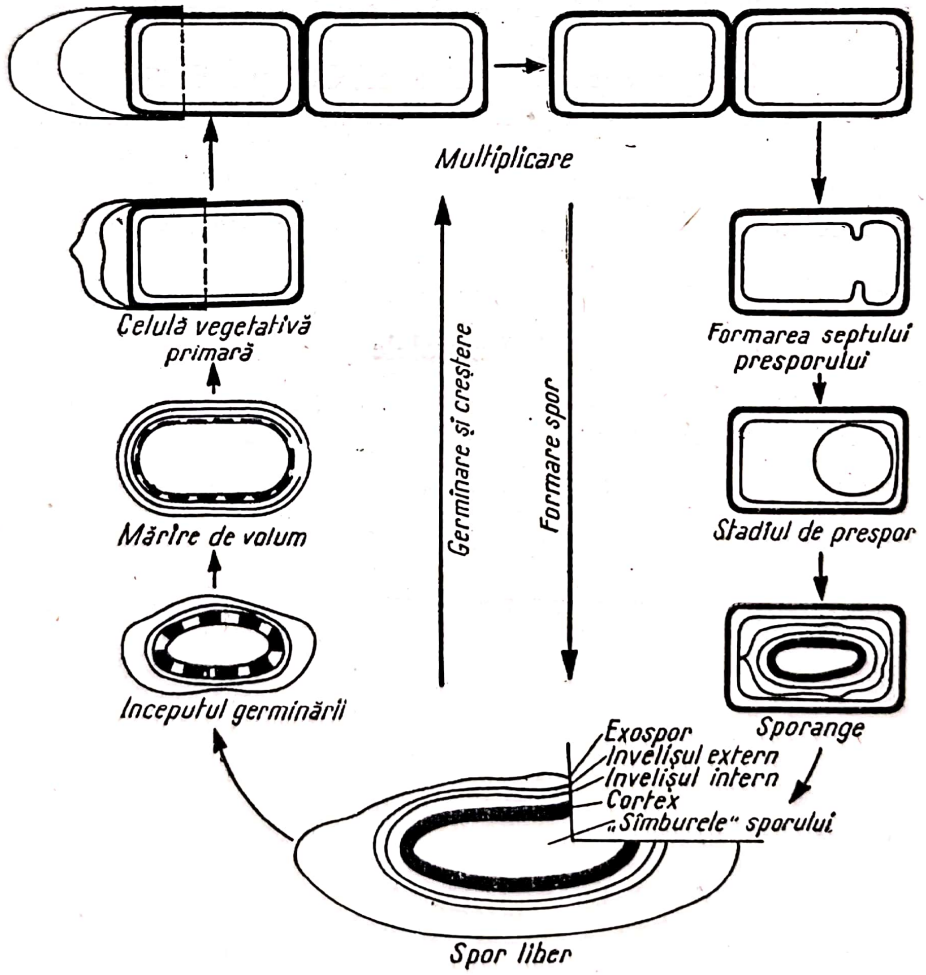


Fig. 126. Reprezentare schematică a stadiilor succesive ale procesului de creştere vegetativă, sporogeneză şi germinare a sporului la *Bacillus subtilis*.

rulare putînd fi oprit tocmai prin degradarea sau deteriorarea acestor condiţii. O dată apărut, particularităţile sale de structură şi de funcţie permit sporului să se comporte ca o formă de rezistenţă care păstrează intacte toate caracterele genotipice ale formei vegetative originare şi le transmite ca atare celulei rezultate din germinarea lui. Sporii au o rezistenţă mare la căldură, tolerînd uneori expuneri de cîteva ore la 120°C, cîteva minute la 180° (uneori chiar 2—3 ore la 115°—200°C — *căldură uscată*) şi suportă contactul cu unele substanţe antibacteriene, rămînînd vii o săptămînă în fenol 5% şi mai multe săptămîni în alcool etc. Datorită marii lui rezistenţe şi lipsei aproape complete de metabolism, sporul are o longevitate foarte mare, asigurînd supravieţuirea speciei în natură. Astfel sporii de *B. anthracis* sînt viabili timp de peste 70 de ani, iar aceia ai unor bacterii saprofite, aflaţi în conserve alimentare, peste 114 ani. După unii autori, sporii şi-ar păstra viabilitatea zeci, sute şi chiar mii de ani. S-au găsit spori viabili în roci scoase de la o adîncime de 37—45 m, ajunşi acolo probabil în era cuaternară, în timpul glacialului (prezenţa iniţială a unui număr de 5—10 spori pe gram de rocă exclude contaminarea ei după recoltă).

Întrucît, cu foarte rare excepţii, într-o celulă bacteriană apare numai un singur spor, iar dintr-un spor se formează numai o singură celulă vegetativă, sporul bacterian reprezintă în esenţă o formă obligatorie de conservare a speciei şi nu o formă de rezistenţă la condiţiile defavorabile ale mediului sau o formă de reproducere a speciei ca diferitele tipuri de spori ai fungilor.

j. Vacuolele

Vacuolele sînt formaţii sferice cu diametrul de 0,3—0,5 μ, mai puţin refringente decît citoplasma, care apar în celula bacteriană în perioada ei de creştere activă.

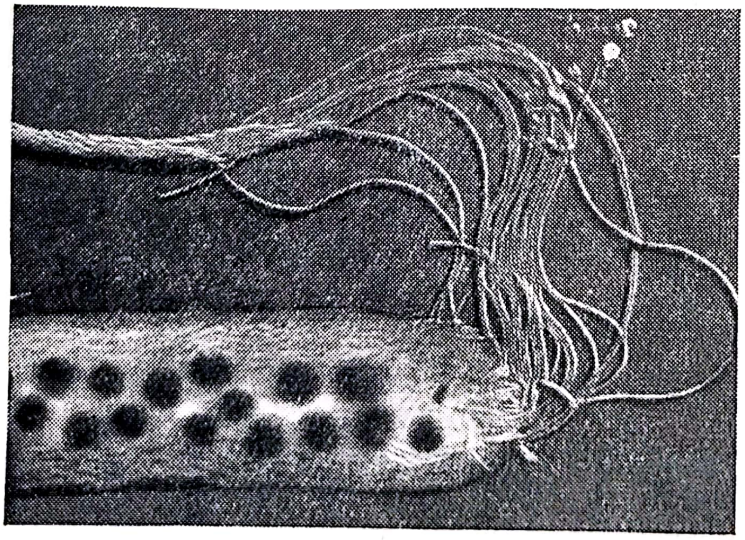


Fig. 127. Vacuole conţinînd gaze la *Halobacterium halobium* (după Houwink).

Numărul lor este variabil în raport cu mediul de cultură (6—20 de vacuole pe celulă). Ele conţin diferite substanţe dizolvate în apă şi sînt înconjurate la periferie de un înveliş lipoproteic unistratificat, gros de aproximativ 30 Å, numit *tonoplast*.

La bacteria halofilă *Halobacterium halobium* s-au descris vacuole cu conţinut gazos constînd probabil din azot provenit din aer sau rezultat din metabolism. Astfel de vacuole sînt vizibile la microscopul electronic, deoarece ele nu se turtesc prin uscarea celulei.

Semnificaţia biologică. În prezent nu se ştie dacă vacuolele apar ca rezultat al activităţii metabolice şi al acţiunii unor condiţii de mediu sau dacă reprezintă un loc de acumulare al produşilor de degradare sau toxici pentru celulă. După unii cercetători, vacuomul ar constitui o entitate permanentă, absolut necesară celulei bacteriene, în timp ce după alţii el ar fi o structură temporară care apare "de novo", sub influenţa condiţiilor de mediu. Knaysi consideră că vacuolele se formează ca rezultat al pătrunderii în celulă a unei cantităţi de apă în exces, care apoi se separă în picături în care se dizolvă produşii de metabolism hidrosolubili, în timp ce lipidele şi proteinele acumulate în jurul acestor picături ar forma tonoplastul. Vacuolele pline cu lichid ar îndeplini rolul de regulatori ai presiunii osmotice în raport cu mediul extern, iar cele care conţin gaze ar permite celulelor să se ridice la suprafaţa mediilor lichide, asigurînd astfel contactul lor cu aerul.

k. Incluziile

Incluziile sînt formaţii structurale inerte care apar în citoplasma bacteriilor la sfîrşitul perioadei lor de creştere activă. Prezenţa şi abundenţa incluziilor variază în funcţie de condiţiile de mediu. Ele pot fi clasificate în funcţie de compoziţia lor chimică.

1) *Polimerii organici* se acumulează în cantităţi mari (4—50% din greutatea uscată a celulei) în interiorul celulei şi adeseori chiar în jurul ei, mai ales atunci cînd o sursă de carbon şi energie (în special un glucid) a rămas în exces în mediu, după ce creşterea culturii a încetat din cauza epuizării sursei de azot necesare sintezei de proteine şi acizi nucleici. Dacă după formarea acestor incluzii se adaugă în mediu N exogen, polimerii sînt degradaţi pe cale enzimatică şi subunităţile lor constitutive sînt folosite ca sursă de C şi energie pentru sintezele celulare.

— *Incluziile de glicogen şi amidon* (polimeri de glucoză) sînt prezente în special la sporulaţii aerobi. Ele apar ca mase mici de 50—100 mμ Ø, puternic refringente, vîscoase, care se colorează cu iod în galben-brun (glicogenul) sau în albastru (amidonul) în contrast cu citoplasma gălbuie.

— *Incluziile de acid poli-β-hidroxibutiric* (poliester al acidului β-hidroxibutiric) pot fi evidenţiate la microscopul fotonic datorită afinităţii lor mari pentru coloranţii liposolubili de tipul negrului de Sudan. În celulele vii, ele apar ca picături rotunde foarte refringente, cu dimensiuni variabile, care dau

citoplasmei — în funcţie de numărul şi dimensiunile lor — un aspect granular sau vacuolar.

2) *Polimerii anorganici.* Incluziile de polifosfat anorganic, cunoscut şi sub denumirea de metafosfat anorganic polimerizat sau polimetafosfat, formează prin depozitarea lor în citoplasmă entităţile subcelulare cunoscute sub denumirile de *granule de volutină* (descrise iniţial la *Spirillum volutans*), *corpusculi* Babeş-Ernst sau *granulaţii metacromatice*, deoarece se colorează în violet-roşu cu albastru de toluidină sau cu albastru de metilen. După unii cercetători, aceste granulaţii ar conţine şi ARN, fiind în realitate constituite dintr-un complex ARN-metafosfat.

3) *Incluziile anorganice simple* sînt alcătuite din *granulaţii de carbonat de calciu* — cu semnificaţie biologică necunoscută — sau din *granulaţii de sulf coloidal.* Incluziile de S coloidal, prezente la bacteriile sulfuroase crescînd în medii bogate în H_2S, au aspectul unor corpusculi strălucitori birefringenţi. În esenţă, ele constituie o rezervă de S, deoarece dispar dacă bacteriile sînt transferate într-un mediu sărac în H_2S.

Semnificaţie biologică generală. Incluziile sînt structuri legate de activitatea metabolică a celulei bacteriene, reprezentînd în cele mai multe cazuri, materiale de rezervă care se acumulează în diferite regiuni ale celulei atunci cînd dezvoltarea culturii se face în ritm lent sau a încetat. Dovada o constituie faptul că ele sînt mai abundente la bacteriile cultivate în medii bogate în substanţe nutritive sau cu un dezechilibru în raportul C/N şi că dispar după trecerea celulelor în medii sărace sau cu un raport C/N normal. Granulaţiile de volutină, spre exemplu, reprezintă o rezervă de fosfor pentru biosinteza acizilor nucleici şi a fosfolipidelor, utilizabilă în cazul cînd mediul ar fi deficitar în fosfor. Capacitatea celulei bacteriene de a depune substanţele de rezervă sub formă de polimeri reprezintă şi o reacţie de apărare a echilibrului osmotic celular. Prin acest proces de polimerizare, compuşii liberi sînt făcuţi osmotic inerţi, în timp ce acumularea lor ca atare, sub formă de monomeri (glucoză, acid hidroxibutiric etc.), ar mări presiunea osmotică intracelulară dincolo de

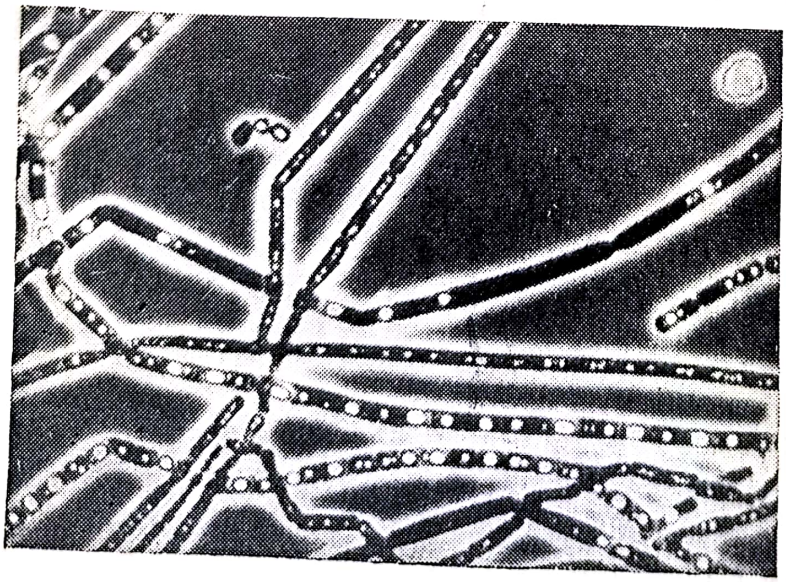


Fig. 128. Globule de poli-β hidroxibutirat la bacteria *Sphaerotilus natans.*

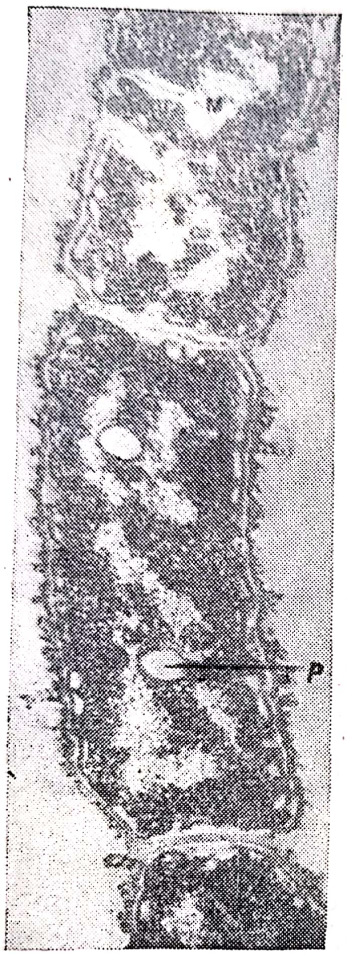


Fig. 129. Secţiune printr-un lanţ de celule de *Clostridium thiosulfatophilum:*
p — incluzii de volutină;
M — mezozom (după Cohen-Baziré).

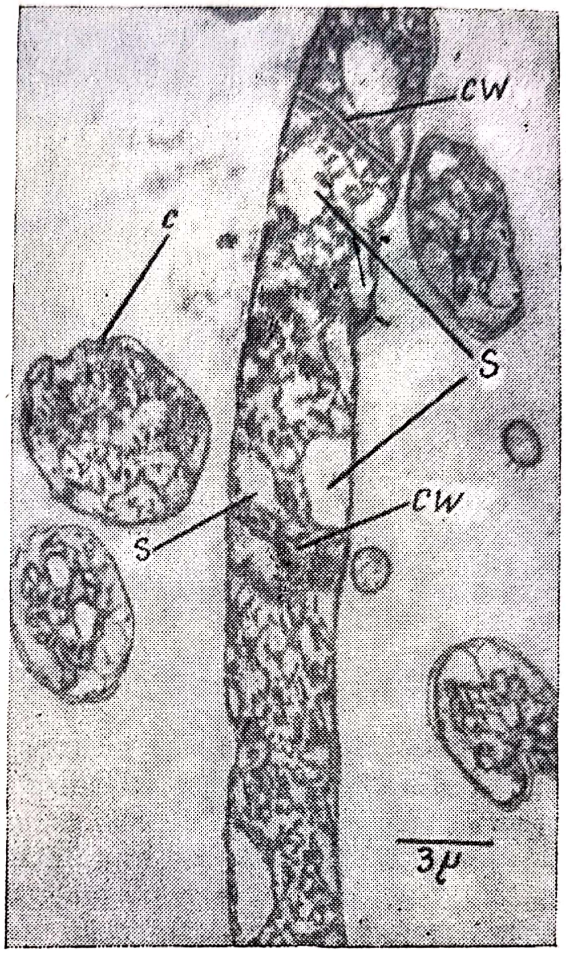


Fig. 130. Secţiune ultrafină prin celule de *Beggiatoa* evidenţiind incluziuni granulare de sulf (*S*), peretele celular (*C*) şi septul transversal (*CW*) (după Morita).

limita de rezistenţă a peretelui celular, ceea ce ar produce liza celulei. În plus, în cazul incluziilor de acid poli-β-hidroxibutiric, polimerizarea împiedică acidifierea citoplasmei, blocînd prin esterificare grupările carboxil ale monomerului de acid-β-hidroxibutiric.

1. Capsula şi stratul mucos

Unele bacterii au proprietatea de a elabora, în anumite condiţii de mediu, un material macromolecular cu caracter vîscos, gelatinos. După unii autori, această proprietate ar exista potenţial la toate bacteriile, dar s-ar manifesta regulat numai la unele specii, în timp ce la altele ea s-ar traduce doar prin prezenţa unei formaţii foarte fin organizate, invizibilă cu mijloacele uzuale de cercetare.

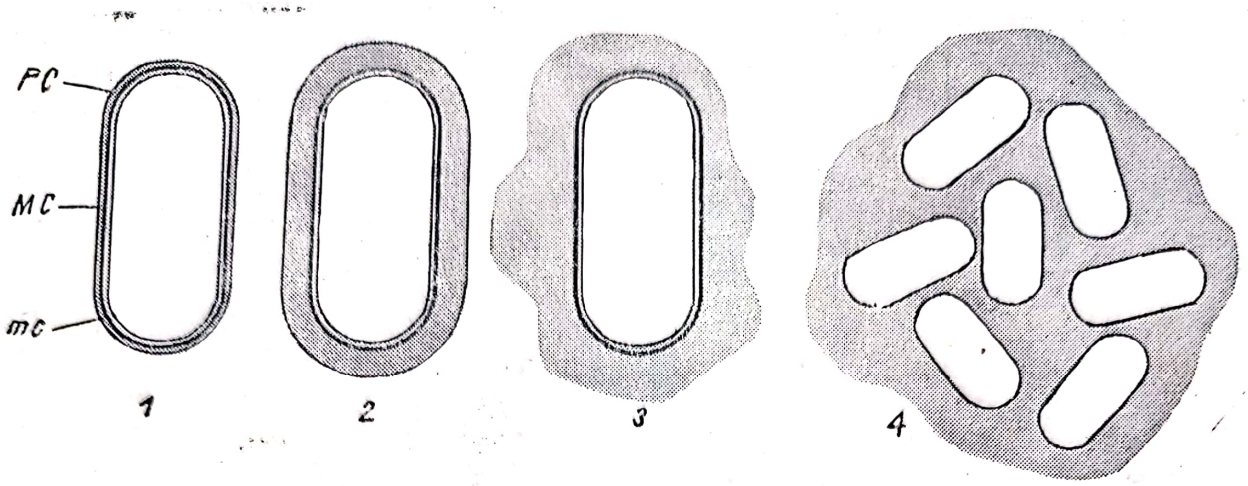


Fig .131. Tipurile de structuri capsulare la bacterii:
1 — microcapsula; *2* — capsula propriu-zisă; *3* — strat mucos; *4* — zooglee. *P.C.* — peretele celular; *MC* — microcapsula; *mc* — membrana citoplasmatică.

Substanţa mucoidă este mai mult sau mai puţin difuzibilă în mediul înconjurător. În funcţie de raporturile sale cu celula respectivă, ea se poate prezenta sub următoarele forme: *a*) *microcapsula* (W i l k i n s o n), corespunzînd tipului de organizare în care substanţa mucoidă alcătuieşte în jurul celulei bacteriene un strat atît de fin, încît este nedetectabil prin metodele microscopice (de exemplu, antigenele de suprafaţă care conferă virulenţa unor bacterii patogene); *b*) *capsula*, a cărei substanţă mucoidă, depusă la suprafaţa celulei ca o formaţie morfologic distinctă şi demonstrabilă prin metode citologice, înveleşte de jur împrejur fiecare celulă sau pereche de celule; *c*) *stratul mucos*, masă amorfă neorganizată, ale cărei componente vîscoase se dispun fără semnificaţie anatomică, în jurul celulei bacteriene; *d*) *zooglea* sau *masa zoogleică* (formaţie impropriu denumită astfel), în care stratul mucos leagă într-o singură masă mai multe celule, alcătuind adevărate colonii mucilaginoase de bacterii.

Morfologie. Capsula apare la microscop ca un halou incolor în jurul celulei bacteriene. Dimensiunile ei variază foarte mult în raport cu corpul bacterian: la unele specii ea este foarte subţire, în timp ce la altele grosimea ei depăşeşte cu mult diametrul transvers al celulei. Capsula este lipsită de o membrană morfologic diferenţiată.

Structură. În general, capsula bacteriilor este aparent lipsită de structură, amorfă, deşi în unele cazuri s-a pus în evidenţă o lipsă de omogenitate care ar trăda un anumit grad de organizare.

T o m c s i k a arătat că la unele tulpini de *B. megaterium*, capsula are o structură complexă, fiind formată din două tipuri de molecule, şi anume din polizaharide capsulare sub formă de conglomerate şi dintr-o masă polipeptidică în care sînt incluse conglomeratele polizaharidice. La alte tulpini ale aceleiaşi specii, capsula prezintă de-a lungul suprafeţei ei crestături în formă de zimţi care se succed la distanţe regulate.

Datorită indicelui său de refracţie foarte apropiat de acela al mediului, capsula este greu de observat prin microscopie directă. Avînd o afinitate slabă pentru coloranţi, ea poate fi evidenţiată numai prin coloraţii speciale cu mordansare, sau apare ca o imagine negativă după colorarea cu tuş de China (se colorează celula bacteriană şi fondul preparatului, în timp ce capsula rămîne ca un halou pericelular incolor şi refringent). După coloraţiile uzuale ea rămîne, de asemenea, ca un halou incolor.

Fiind puţin opacă pentru electroni, capsula nu apare clar sau este chiar invizibilă la microscopul electronic.

Prezenţa stratului mucos şi a capsulei dă culturilor pe medii lichide un caracter vîscos, siropos, datorită difuzării în mediu a unora dintre substanţele capsulare. Coloniile pe medii solide au un aspect umed, lucios, mucoid şi dovedesc o consistenţă mucoasă atunci cînd sînt ridicate cu firul de platină de pe mediu.

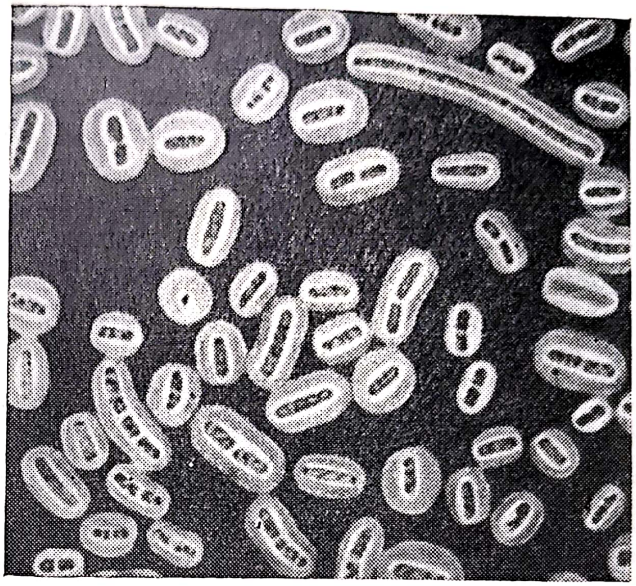


Fig. 132. Capsula la *Bacillus megaterium* — coloraţie cu tuş de China.

Compoziţia chimică a capsulei şi a stratului mucos este diferită de aceea a celulei bacteriene. În general, ele sînt de natură polizaharidică (polimeri de glucoză, fructoză, fucoză, acid uronic etc.), fapt care explică — prin gradul înalt de polimerizare al acestor molecule — atît consistenţa vîscoasă, gelatinoasă, cît şi refringenţa caracteristică a acestor formaţii. La unele microorganisme (*B. anthracis* şi alţi sporulaţi aerobi) capsula este de natură polipeptidică (polimeri de acid *D*-glutamic). Este de semnalat, în plus, că unele specii bacteriene pot elabora simultan atît un strat mucos, cît şi o capsulă, cele două tipuri de formaţii conţinînd polizaharide cu compoziţii chimice diferite.

De asemenea, tulpini ale aceleiaşi specii pot forma substanţe capsulare diferite din punct de vedere chimic, ceea ce permite diferenţierea lor serologică în scopuri diagnostice.

Originea capsulei şi a stratului mucos nu este încă bine lămurită. Există în prezent mai multe ipoteze în această privinţă:

— *Ipoteza originii endocelulare.* Capsula nu ar face parte integrantă din celulă, ci ar fi un rezultat al activităţii metabolice, un produs de excreţie sau de secreţie, care, datorită slabei lui solubilităţi în mediu, ar avea tendinţa de a se depune în jurul celulei. Această ipoteză nu explică în ce mod difuzează prin peretele celular moleculele mari de polizaharide capsulare (de exemplu, greutatea moleculară a dextranului este 45 000—500 000), fără să antreneze la exterior constituenţi protoplasmatici cu molecule mai mici.

— *Ipoteza originii parietale.* Capsula ar proveni dintr-o modificare a peretelui celular care ar suferi un proces de hipertrofie însoţită de gelificarea constituenţilor săi.

— *Ipoteza originii extracelulare.* Polizaharidele capsulare şi cele ale stratului mucos ar fi sintetizate în mediul de cultură sub acţiunea exoenzimelor

bacteriene şi s-ar depune ulterior pe suprafaţa celulei. Dovada ar constitui-o faptul că asemenea substanţe pot fi sintetizate şi în medii acelulare ca, de exemplu, în filtratul steril al unei culturi de *Leuconostoc mesenteroides*, unde enzimele care au difuzat în mediu pot cataliza sinteza unor substanţe de tip capsular, identice din punct de vedere chimic cu componentele capsulei care înconjură celula (H e h r e). Deşi capacitatea de elaborare a capsulei sau a unui strat mucos constituie un caracter ereditar — determinat genetic — al anumitor specii bacteriene, ea poate să nu se manifeste atunci cînd condiţiile de mediu nu sînt cele adecvate biosintezei respective sau poate fi pierdută prin mutaţie. Pe de altă parte, celulele care nu au această capacitate o pot dobîndi prin recombinare genetică, după ce au primit prin transfer determinantul genetic corespunzător de la o bacterie formatoare de capsulă sau de strat mucos. Dintre bacteriile care formează capsulă numai atunci cînd cresc pe un mediu conţinînd precursorul biochimic direct al materialului capsular, importantă din punct de vedere practic este *Leuconostoc mesenteroides*. În prezenţa zaharozei, bacteriile de această specie elaborează o mare cantitate de substanţă mucilaginoasă, care se depune pericelular sau difuzează în mediu. Această substanţă mucilaginoasă, care este un *dextran*, poate fi folosită ca substituent de sînge pentru transfuzii. Acest microorganism contaminează materia primă din fabricile de zahăr, unde produce mari pierderi economice, deoarece descompune sucul de sfeclă de zahăr supus prelucrării.

Semnificaţia biologică a capsulei: a) capsula nu reprezintă o parte integrantă din celula bacteriană, ci un produs inert, care rezultă din activitatea ei metabolică şi care, de aceea, poate fi îndepărtat fără ca viaţa celulei să sufere; *b*) capsula protejează celula bacteriană de efectul nociv al desicaţiei, datorită proprietăţilor sale higroscopice; *c*) la bacteriile patogene, capsula exercită un rol protector şi faţă de acţiunea fagocitelor, fie direct, împiedicînd adeziunea la suprafaţa leucocitului, fie indirect, prin efectul chimiotactic negativ — antifagocitar — al substanţelor pe care le conţine. Datorită acestui fapt, bacteriile patogene capsulate au o virulenţă mai mare pentru om şi animale.

m. Cilii sau flagelii

Cilii sînt *apendici filamentoşi* unici sau multipli dispuşi la suprafaţa bacteriilor mobile; prin analogie cu organele de locomoţie ale protozoarelor, ei au fost numiţi şi flageli.

Posibilitatea celulei de a se mişca independent nu este o caracteristică generală în lumea bacteriilor, ci se întîlneşte numai la anumite specii. Ea s-a dezvoltat probabil o dată cu alungirea celulei bacteriene, fiind prezentă la bacili, vibrioni, spirili şi numai excepţional la bacteriile sferice.

Morfologie. Cilii sînt filamente subţiri, flexibile şi fragile, de formă helicală cu spire de amplitudine neuniformă. Pe preparatele uscate, în care uscarea cililor s-a făcut în plan orizontal, ei apar ca formaţii ondulate, încurbate neregulat. Forma lor tipică este cea cilindrică, deşi uneori pot apărea turtiţi ca o panglică.

Lungimea cililor variază în funcţie de specie, dar în general ea este mult mai mare decît aceea a celulelor care îi poartă, ajungînd să atingă la unii spirili pînă la 25—72 μ. Ei sînt mai lungi la celulele bătrîne şi la cele care trăiesc în medii lichide, iar la aceeaşi celulă pot avea lungimi diferite, în funcţie de vîrsta lor. La bacteriile sporulate (de exemplu, *B. subtilis*), cilii apar la o oră după germinaţie (uneori chiar şi mai înainte) şi cresc cu 1 μ la fiecare 2—3 minute. Grosimea cililor, variabilă după specie şi condiţiile de mediu, este uniformă pe toată lungimea lor şi variază între 100 şi 200 Å, valori sub limita puterii de rezolvare a microscopului cu lumină. Prezenţa cililor poate fi dedusă indirect, observîndu-se mobilitatea germenilor în preparate proaspete între lamă şi lamelă sau poate fi evidenţiată chiar direct, dar numai prin microscopie electronică sau prin colorare cu tehnici speciale, cu ajutorul cărora grosimea cililor este mărită pînă la a-i face vizibili la microscopul fotonic prin depunerea unui precipitat de colorant la suprafaţa lor.

Dispoziţia cililor la suprafaţa celulei bacteriene, ca şi numărul lor, sînt în general caracteristice pentru o anumită specie şi de aceea reprezintă un caracter taxonomic important. Din acest punct de vedere s-au descris următoarele tipuri de bacterii: *a*) *bacterii atriche*, lipsite de cili; *b*) *bacterii monotriche*, prevăzute cu un singur cil (de exemplu, *Vibrio*); *c*) *bacterii amfitriche*, cu cîte un cil la fiecare pol al celulei; *d*) *bacterii lophotriche* (de la gr. *lophos*=smoc de păr), cu un smoc de 5—30 de cili la unul sau la ambele capete ale celulei (de exemplu, *Spirillum marinus*); *e*) *bacterii peritriche*, cu 30—100 de cili situaţi de jur împrejurul celulei (de exemplu, *Proteus vulgaris*, *Rhizobium leguminosarum*). *Inserţia* cililor pe celulă poate fi polară (la una sau la ambele ei extremităţi), subpolară, laterală sau pericelulară.

Ultrastructură şi structură moleculară. Iniţial s-a crezut că flagelul bacterian este un filament unic, ondulat sau helical, lipsit de o structură internă. Micrografiile electronice şi difracţia razelor X au demonstrat că nu există un model unitar de structură al cililor bacterieni. La unele specii ei sînt formaţi din 3—10 fibrile helicale extrem de fine (33—56 Å), care apar în unele cazuri ca şi cum ar fi strîns împletite între ele. La unele specii (ca *Vibrio metchnikovii*), cilul constă dintr-un filament axial format din două fibrile împletite în elice dublă, gros de 120—150 Å şi rezistent la digestia triptică, învelit într-o teacă periferică, alcătuită tot din fibrile dar digerabilă cu tripsină.

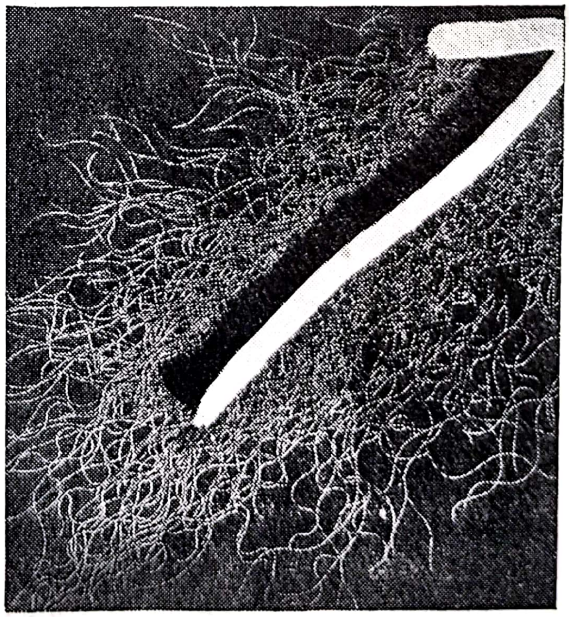


Fig. 133. Celulă bacteriană peritrihă (după Robinow).

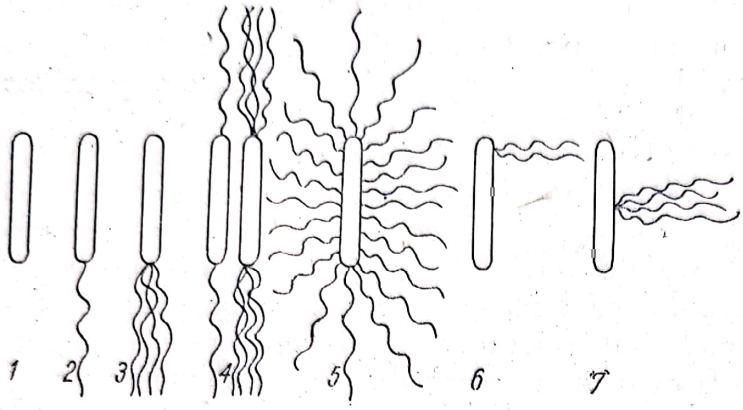


Fig. 134. Diferite tipuri de bacterii ciliate:
1 — bacterie atrihă (neciliată); *2* — monotrihă; *3* — lofotrihă; *4* — amfitrihă; *5* — peritrihă; *6* — cili inseraţi subterminal; *7* — cili inseraţi ecuatorial.

Originea cilului, care în cursul creşterii lui străbate membrana citoplasmatică şi peretele celular, este localizată la nivelul unei formaţiuni relativ sferice, situată în citoplasmă imediat sub membrana citoplasmatică, de 110—140 Å şi uneori chiar 250—400 Å în diametru, denumită *structură bazală, corp bazal* sau *organit bazal* şi echivalentă cu blefaroplastul protozoarelor flagelate şi cu kinetosomul ciliatelor. Porţiunea bazală a flagelului, de forma unui cîrlig sau a unei undiţe, pare ancorată în citoplasmă ca şi cum ar lua naştere din structura sferică a corpului bazal. Recent, lucrînd cu spirili fotosintetizanţi (*Rho-*

Fig. 135. Structura fină elicoidală a unui cil bacterian (după Starr).

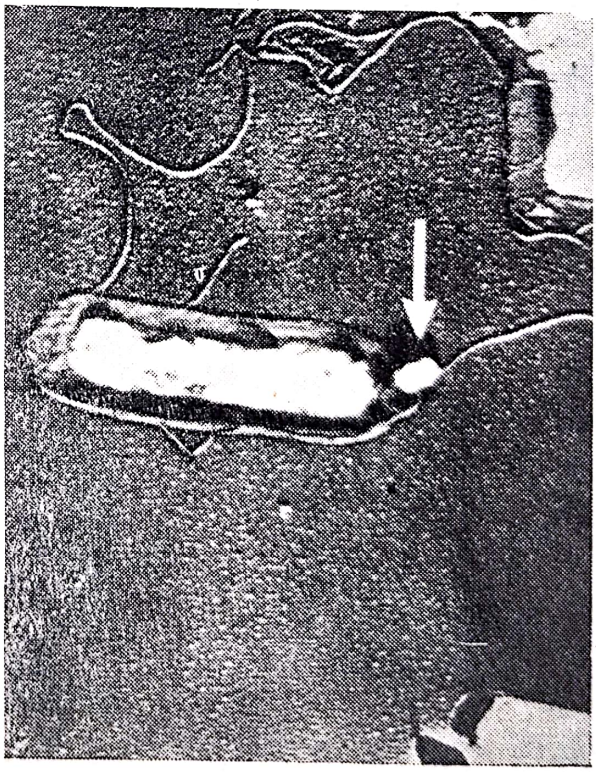


Fig. 136. *Clostridium botulinum*. Microelectronografie evidenţiind inserţia endocelulară a cilului pe un corpuscul bazal similar blefaroplastului (după Scanga).

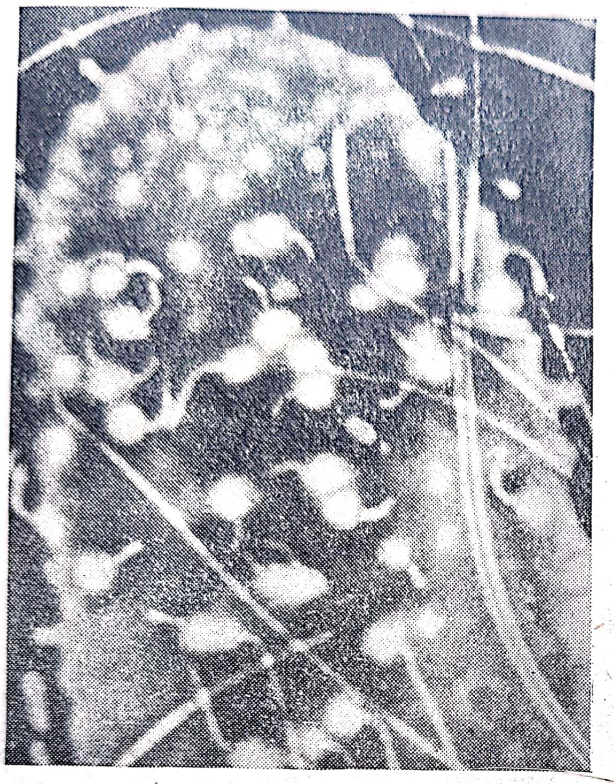


Fig. 137. Inserţia flagelilor la *Proteus vulgaris* prin intermediul unor formaţiuni în „cîrlig de undiţă" asociate cu corpusculi sferici intracitoplasmatici (după Dinah Abram).

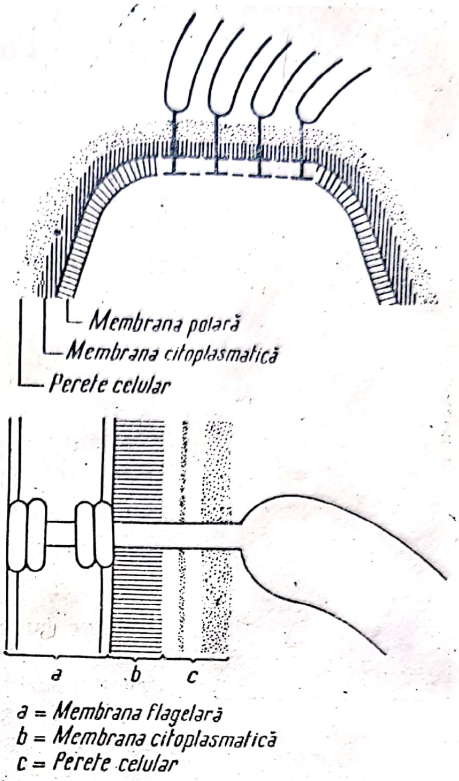


Fig. 138. Structura corpusculului bazal al flagelilor la *Spirillum: sus* — relaţiile regiunii bazale a flagelului cu învelişurile celulei bacteriene; *jos* — reprezentarea schematică a diferiţilor constituenţi ai organitului bazal şi raporturile lui cu învelişurile celulei. Se observă prezenţa unei „membrane" flagelare care leagă între ele perechile de discuri ale corpusculului bazal şi fixează întreaga structură de membranele celulare.

dospirillum rubrum) Cohen-Bazire a descris organite bazale mai complicate, constînd din două discuri angrenate în aşa fel încît sugerează aspectul unor butoni de manşetă închişi sau al unor haltere. Rolul structurii bazale nu este precizat, astfel încît în această privinţă nu există deocamdată decît presupuneri: *a*) ea ar putea reprezenta locul de sinteză sau de asamblare structurală a flagelinei — proteina flagelară — în vederea formării flagelului, comportîndu-se ca un „compartiment" din citoplasmă în care se acumulează o concentraţie suficient de mare de monomeri de flagelină pentru a permite polimerizarea lor sub formă de structuri fibrilare cu dispoziţie tipică; *b*) ar funcţiona ca un simplu sediu de ancorare a flagelului; *c*) ar participa în mod activ la motilitatea flagelului graţie contiguităţii ei strînse cu membrana citoplasmatică, sediul multor enzime cu rol în procesele energetice.

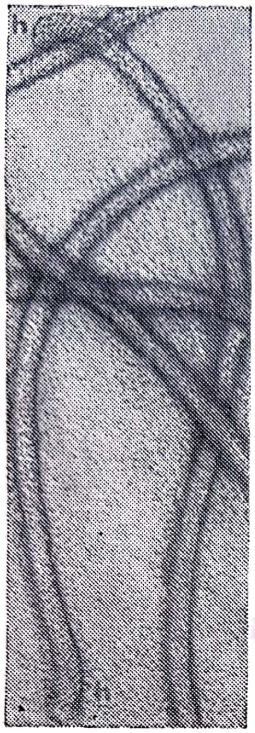


Fig. 139. Flageli bacterieni izolaţi în stare pură: *h* — regiunea bazală — ancorată în citoplasmă (după Abram).

O dată apăruţi după germinarea sporului (de exemplu la *B. subtilis*), flagelii cresc repede, cu 0,5 μ minut şi ajung în 10—20 de minute la lungimea lor maximă.

Compoziţia chimică. Din punct de vedere chimic, flagelul bacterian este format dintr-un singur tip de proteină — *flagelina* — care în stare monomeră se prezintă sub formă de particule sferice izodiametrice (46 Å) cu greutate moleculară relativ mică (40 000). Flagelul este alcătuit de obicei prin polimerizarea acestor unităţi monomere în mai multe şiruri lungi, de formă regulat-helicoidală şi cu diametrul de 100—200 Å. Grosimea flagelului şi lungimea de undă a helicei fibrilare sînt caractere constante pentru o specie bacteriană dată, reflectînd probabil diferenţe de structură primară a flagelinei specifice, structură care la rîndul său influenţează modul de polimerizare din care rezultă structura secundară fibrilară.

Lowy şi Hanson (1964) sugerează, pe baza microelectronografiilor cu contrast negativ, existenţa a două tipuri principale — *A* şi *B* — de structură moleculară a flagelilor. *Structura de tip A* ar corespunde flagelilor formaţi din subunităţi mici, aproximativ sferice, aranjate în şiruri longitudinale, în care subunităţile sferice alternează unele în raport cu celelalte din şirurile adiacente. Se observă, de asemenea, striaţii oblice formînd cu axul flagelului un unghi mai mare de 45°, care leagă între ele subunităţile din şirurile adiacente. Numărul de şiruri longitudinale de subunităţi sferice depinde de specie (4—5—6). *Structura de tip B*, caracterizată prin absenţa subunităţilor globulare şi a striaţiilor oblice, ar fi formată din structuri liniare longitudinale, foarte bine marcate, dispuse paralel cu axul flagelului. Numărul lor ar fi caracteristic pentru o anumită specie bacteriană.

După Lowy, tipul structural de flagel este constant numai pentru o anumită tulpină dată, astfel încît diferitele tulpini ale unei specii pot diferi între ele prin structura flagelului. În unele cazuri, cele două tipuri de structuri se întîlnesc alternativ în acelaşi flagel.

Bazele biochimice ale contracţiei flagelilor. Contracţia flagelilor se realizează după un mecanism care, probabil, este similar aceluia al contracţiei musculare. Energia necesară acestui proces este furnizată de ATP şi este folosită pentru modificarea formei moleculelor de proteină flagelară, ceea ce se traduce prin contracţia fibrilelor din structura flagelului. Microorganismele aerobe regenerează ATP numai în prezenţa O_2 dizolvat, oxidînd rezervele lor intracelulare prin intermediul citocromilor; aşa se explică de ce mişcarea aerobilor încetează în anaerobioză şi este reluată la restabilirea contactului cu aerul. Microorganismele anaerobe produc ATP prin degradarea argininei la ornitină, urmată de transformarea ADP în ATP.

Semnificaţia biologică. Cilii reprezintă organele de locomoţie ale bacteriilor mobile, aşa-numite „liber înotătoare". Mişcarea cililor se realizează prin contracţii rapide şi ritmice propagate de la o extremitate la alta a flagelului care-şi conservă forma spiralată.

Datorită cililor, bacteriile se mişcă în mediile lichide rapid şi liniar, aproape fără răsucire în cazul flagelului unic şi polar, în timp ce formele peritriche

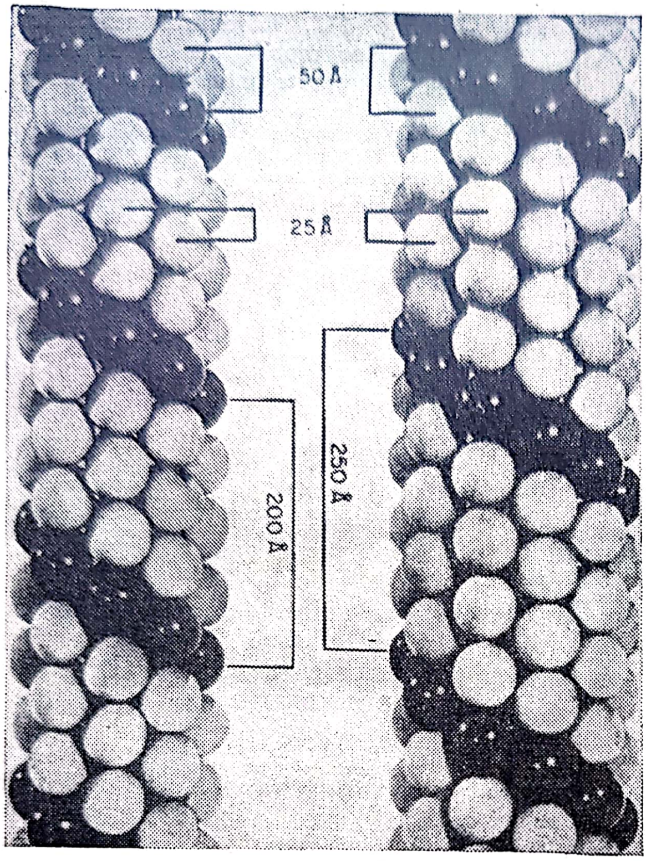


Fig. 140. Modele de aranjare a unor unităţi moleculare globulare în flagelii de tip *a* (după Löwe).

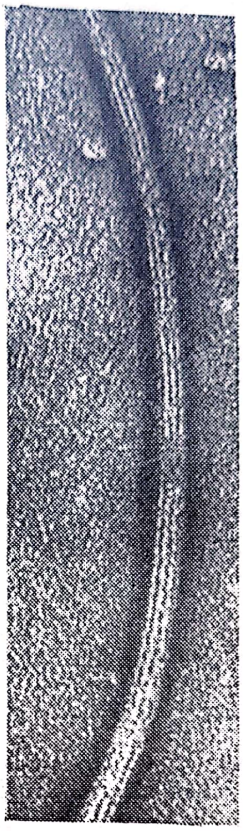


Fig. 141. Structura fagelilor de tip *B* la *Pseudomonas fluorescens* (după Löwe).

se mişcă mai neregulat şi prin răsuciri caracteristice. În condiţii speciale de observare, s-a constatat că cilul unic şi gros poate precede celula în mişcare, pe cînd cilii foarte subţiri, care nu pot învinge rezistenţa mediului, atîrnă ca o coadă în urma celulei.

Viteza mişcării, variabilă cu specia ca şi cu dispoziţia şi numărul cililor, este mai mare la celulele tinere şi în condiţii favorabile de mediu. Raportată la dimensiunile celulei, viteza deplasării este excepţional de mare: distanţa parcursă într-o secundă, obişnuit egală cu de 10—15 ori lungimea bacteriei, poate ajunge să echivaleze de 100 de ori această dimensiune a celulei. Astfel, *E. coli* se deplasează cu 28 μ/s (10 cm/h), *Spirillum volutans* cu 63 μ/s, *Vibrio comma* cu 55 μ/s. Unele bacterii extrem de mobile se pot deplasa într-o secundă pe o distanţă egală cu de 100×lungimea celulei [1].

[1] Raportată la lungimea organismului această viteză este fără echivalent în biologie şi ar corespunde pentru om la circa 600 km/h. Animalele care fug repede se deplasează cu viteze incomparabil mai mici (ghepardul cu 110 km/h, iepurele cu 60—70 km/h).

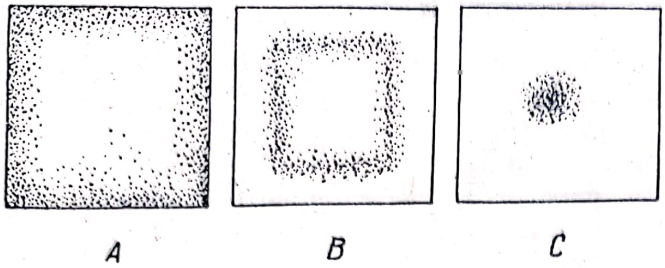


Fig. 142. Răspunsul aerotaxic al bacteriilor mobile pus în evidenţă în preparate între lamă şi lamelă:

A — bacterii aerobe, la marginile lamelei, unde concentraţia de oxigen este maximă; *B* — bacterii microaerofile, la oarecare distanţă de marginile lamelei; *C* — bacterii anaerobe stricte, în regiunea centrală a preparatului (după Beijerinck).

Cilii pot fi pierduţi sau pot deveni nefuncţionali prin mutaţie, fără ca aceasta să afecteze viaţa celulei. Locomoţia este posibilă uneori la bacterii şi în lipsa cililor. Astfel *Myxobacteriile* şi bacteriile sulfuroase din genul *Beggiatoa* se pot deplasa pe un substrat solid printr-o alunecare lentă cu viteză relativ mică (0,1—0,2 μ, maximum 3 μ/s). În afară de alunecarea pe suprafeţe solide, myxobacteriile — deşi neciliate — sînt capabile de mişcări pendulare şi de rotaţie, de ondulări ale corpului şi de mişcări de rostogolire etc.

Influenţa factorilor de mediu asupra mobilităţii eubacteriilor. *Aerotaxia:* În prezenţa unui gradient de concentraţie a O_2 într-un lichid, deplasarea celulelor bacteriene este orientată într-un anumit mod determinat de mecanismele producătoare de energie ale celulei. Prin această mişcare dirijată, fiecare bacterie caută zona de concentraţie în O_2 adecvată tipului său respirator, ceea ce permite metabolismului său producător de energie să funcţioneze cu eficacitate optimă, adică să sintetizeze ATP cu viteza maximă. În această privinţă, există trei tipuri de aerotaxie, corespunzătoare bacteriilor aerobe, anaerobe şi microaerofile. Datorită acestei proprietăţi, bacteriile mobile strict aerobe pot fi folosite ca indicatori sensibili pentru formarea localizată a unor cantităţi foarte mici de O_2 (experienţa lui Engelmann).

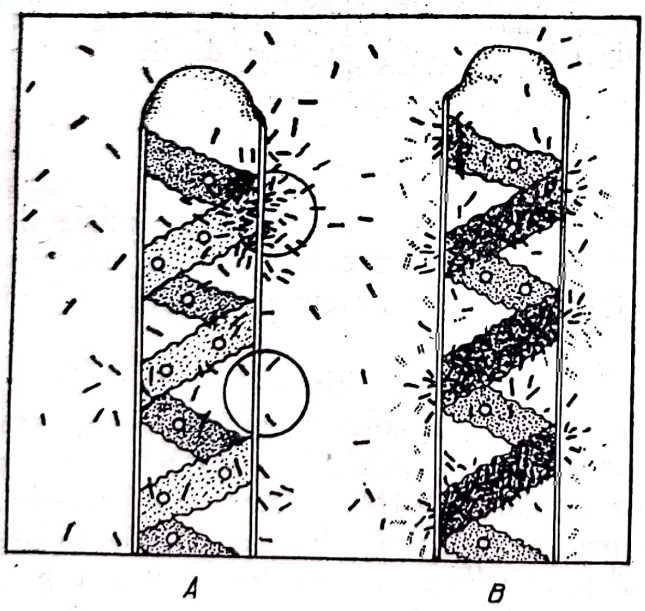


Fig. 143. Evidenţierea microscopică a aerotaxiei bacteriilor aerobe mobile cu ajutorul algei *Spirogyra:*

A — bacterii concentrate într-o zonă circulară intens luminată a cloroplastului, unde se libereazǎ oxigen; *B* — în cazul iluminării întregului preparat gruparea bacteriilor corespunde dispoziţiei intracelulare a cloroplastului spiralat (după Engelmann).

Fototaxia. Bacteriile purpurii mobile — capabile de fotosinteză — răspîndite iniţial uniform într-un preparat umed între lamă şi lamelă răspund la prezenţa unor stimuli luminoşi, aplicaţi într-o zonă strict delimitată a preparatului, acumulîndu-se după 10—15 minute în zona luminată şi părăsind zonele întunecate ale preparatului. O dată ajunse în această zonă luminoasă, ele nu o mai pot părăsi, deoarece orice deplasare spre zona întunecată a preparatului este urmată de o revenire bruscă, printr-o „mişcare de teroare", spre regiunea luminată. Fototaxia este determinată de necesitatea menţinerii la un anumit nivel a vitezei de sinteză a ATP, care este direct proporţională cu intensitatea luminii. Aşa-numita „mişcare de teroare" reprezintă un răspuns aproape instantaneu al celulei bacteriene la scăderea bruscă a vitezei de sinteză a ATP.

La unele specii s-au pus în evidenţă deplasări ale celulelor bacteriene dirijate de prezenţa în mediu a unui gradient de substanţe chimice *(chemotaxie)* sau de diferenţe de temperatură *(termotaxie)*.

n. Pilii

Fig. 144. Pili de tip I izolaţi în stare pură (microelectronografie după Brinton).

Pilii sînt apendici filamentoşi pericelulari prezenţi la bacteriile Gram-negative, în special la tulpinele recent izolate din mediile naturale. Descoperiţi în 1949 de Anderson, ei au fost iniţial denumiţi *filamente* (Houwink şi Van Iterson), apoi *fimbrii* de Duguid (1955) (de la lat. *fimbria*=franjuri). Denumirea de pili (de la lat. *pilus*=păr) a fost dată de Brinton (1954). Prea subţiri pentru a fi vizibili la microscopul fotonic, pilii au putut fi evidenţiaţi numai prin microscopie electronică. S-au descris 6 tipuri de pili, morfologic şi funcţional distincte, denumite convenţional tipurile I—V şi F. Spre deosebire de cili, pilii sînt mai rectilinii şi aparent rigizi; ei sînt dispuşi de obicei uniform pe întreaga suprafaţă a celulei. Numărul lor, caracteristic pentru o celulă, variază între 1 (tipul V), 1—4 (tipul F) şi 100—200—400 (tipurile I, II, III, IV). În timp ce diametrul pililor este foarte constant pentru un tip dat, lungimea lor este variabilă, chiar la aceeaşi celulă, fiind cuprinsă între 1 şi 20 μ.

Structura internă a pililor nu prezintă variaţii notabile în funcţie de tip. Pilii de tip I apar ca formaţiuni tubulare cu diametrul extern de 70 Å şi cel intern de 20—25 Å, alcătuite dintr-o singură subunitate de construcţie — molecula de *pilină* — cu gr. mol. 16 600, formată din cel puţin 163 de resturi de aminoacizi. Pilii de tip F, cu o lungime cuprinsă între 1 şi 20 μ, au de asemenea o structură tubulară cu Ø extern de 85 Å şi cel intern de 25 Å.

Semnificaţie biologică. Prezenţa pililor este controlată genetic. Ei reprezintă un caracter (P^+), care poate fi pierdut prin mutaţie, fără ca aceasta să afecteze viabilitatea celulelor. Pilii de tip I asigură celulelor un avantaj biologic faţă de formele nepiliate (P^-), conferindu-le posibilitatea de a creşte mai bine decît acestea la concentraţii mici de O_2 şi de a continua să se multiplice în faza de declin a culturii, cînd densitatea celulelor este maximă. Ei ar servi ca organite de transport al unor metaboliţi importanţi, probabil macromoleculari. Pe de altă parte, proprietatea pililor, aparţinînd mai multor celule, de a se uni în masă între ei determină formarea unor pelicule de bacterii la suprafaţa mediilor lichide, ceea ce în natură favorizează creşterea celulelor bacteriene saprofite din apele stagnante, slab oxigenate, în profunzime. În sfîrşit,

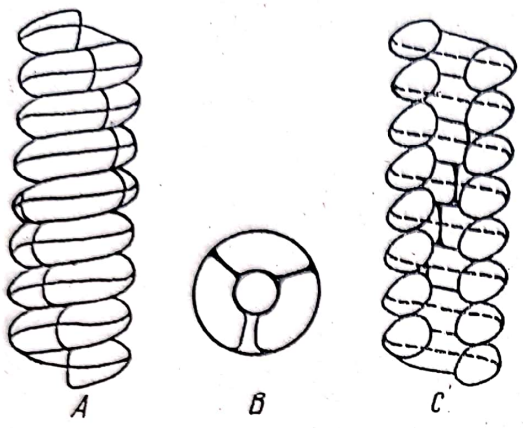


Fig. 145. Model de structură a pililor: *A* — vedere laterală; *B* — vedere terminală; *C* — secţiune transversală.

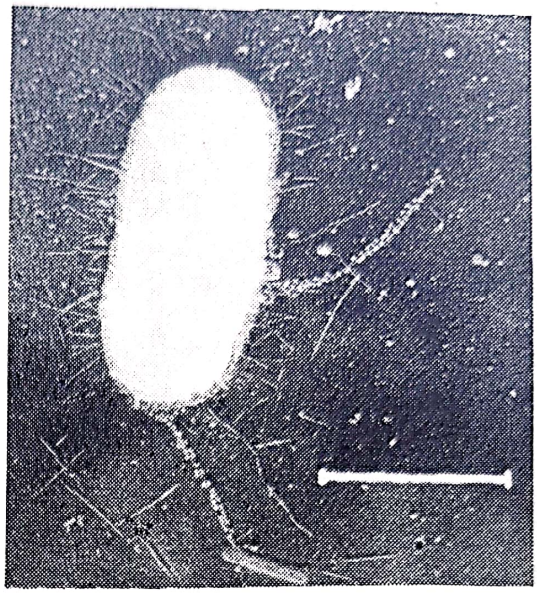


Fig. 146. Pili de tip F la *Proteus mirabilis*. Microelectronografie în care pilii F sînt „marcaţi" prin adsorbţia specifică pe suprafaţa lor a fagilor masculi cu ARN care îi acoperă pe toată lungimea (după Brinton)

capacitatea pililor de a adera de organismele animale, vegetale şi de celule fungice moarte, permite fixarea bacteriilor pe substraturi din care substanţele nutritive se liberează prin liză, excreţie sau difuzie.

Pilii de tip III, IV şi V au funcţii similare; semnificaţia pililor de tip II este încă necunoscută.

Pilii de tip F, descrişi de Brinton la *E. coli* — tulpina K-12 — sînt determinaţi genetic de factorul *F* (denumit şi episomul *F* sau factorul de sex). Ei reprezintă, pe de o parte, receptorii prin intermediul cărora se face adsorbţia pe celula bacteriană a fagilor cu ARN lipsiţi de coadă, aşa-numiţii fagi masculi „m 12" şi „R 17", care infectează numai celulele cu pili F. Pe de altă parte, ei servesc şi drept conduct prin care se realizează transferul ARN fagic în celula bacteriană, suplinind astfel funcţional lipsa „cozii" la aceşti fagi. De aceea, pierderea pililor prin mutaţie ($P^+ \rightarrow P^-$) are drept urmare dobîndirea rezistenţei faţă de infecţia cu fagii „masculi". În sfîrşit, transferul de material genetic (ADN) de la celula bacteriană masculă la o celulă femelă în procesul de conjugare, pare a se face prin intermediul unui pil de tip F, care ar îndeplini deci, în acest caz, funcţia de canal de conjugare. Într-adevăr, diametrul intern al pilului (25 Å) corespunde exact aceluia al moleculei dublu helicale de ADN, care alcătuieşte cromozomul bacterian.

Scanned with OKEN Scanner

COMPOZIŢIA CHIMICĂ A BACTERIILOR

Celula bacteriană are aceeaşi compoziţie chimică, sub raportul elementelor biogene constitutive — C, O, H, N, S, P, Na, K, Ca, Mg etc. ca şi toate celelalte organisme vii. Aceste elemente intră în alcătuirea a diferite tipuri de molecule anorganice (apă, săruri minerale) şi organice (acizi nucleici, proteine, glucide, lipide). Cu toată această identitate cu materialul de construcţie al tuturor celulelor, elementele biogene formează în celula bacteriană în special constituenţi macromoleculari, care o deosebesc de celulele vegetale sau animale. Studiul compoziţiei chimice a bacteriilor se poate face pe două căi: *1)* prin examen microscopic după colorare selectivă prin metode citochimice, care pun în evidenţă localizarea celulară a unei anumite substanţe chimice (de exemplu, coloraţia cu iod pune în evidenţă amidonul şi glicogenul sub formă de granulaţii colorate în albastru şi, respectiv, în negru brun, acidul osmic colorează în negru grăsimile nesaturate ş.a.m.d.); *2)* prin izolarea în stare pură a diferiţilor constituenţi, urmată de identificarea şi dozarea lor.

Compoziţia chimică a celulei bacteriene este controlată genetic în ceea ce priveşte numărul şi diversitatea, atît ale macromoleculelor, cît şi ale unor molecule mici corelate funcţional cu acestea. Genotipul unei celule nu deter-

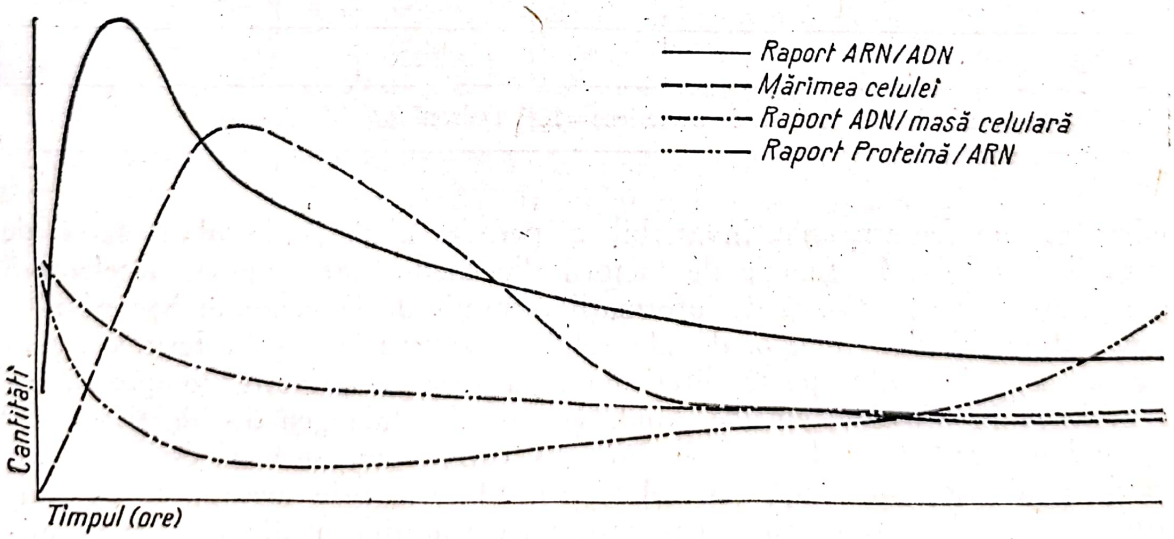


Fig. 147. Variaţiile cantitative ale principalilor constituenţi chimici ai unei culturi de *Aerobacter aerogenes* în raport cu etapele procesului de creştere şi multiplicare (după Hinshelwood).

TABELUL 8

COMPOZIŢIA CHIMICĂ APROXIMATIVĂ A UNEI CELULE DE *ESCHERICHIA COLI* ÎN FAZA DE DIVIZIUNE ACTIVĂ [1]
(după Waston)

Constituentul	% faţă de greutatea totală	Greutatea moleculară medie	Numărul aproximativ de molecule într-o celulă	Număr tipuri molecule diferite
H_2O	70	18	4×10^{10}	1
Ioni anorganici (Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, Fe^{++}, Cl^-, $PO_4^{==}$, $SO_4^{==}$ etc.	1	40	$2,5 \times 10^8$	20
Glucide şi precursori	3	150	2×10^8	200
Aminoacizi şi precursori	0,4	120	3×10^7	100
Nucleotide şi precursori	0,4	300	$1,2 \times 10^7$	200
Lipide şi precursori	2	750	$2,5 \times 10^7$	50
Diferite molecule mici (hem, chinone, produşi de degradare a substanţelor nutritive)	0,2	150	$1,5 \times 10^7$	200
Proteine	15	40 000	10^6	2 000—3 000[6]
ADN	1	$2,5 \times 10^9$	4	1
ARN	6			
ARN_r 16 *S*		500 000	3×10^4	1 (?)
ARN_r 23 *S*		1 000 000	3×10^4	1 (?)
ARN_t		25 000	4×10^5	40
ARN_m		1 000 000	10^3	1 000

[1] Greutatea calculată a unei celule bacteriene $= 10^{12}$ Daltoni.

mină însă un fenotip unic, invariabil, ci permite o gamă destul de largă de variaţii fenotipice în funcţie de factorii din mediu care inhibă, accelerează sau chiar blochează fluxul de informaţii transmis de la genomul bacterian la restul dispozitivelor funcţionale ale celulei. Ca urmare, o bacterie crescută într-un anumit mediu poate diferi mult în ceea ce priveşte compoziţia sa cantitativă în proteine, glucide, lipide etc. de o celulă genetic identică, dezvoltîndu-se într-un mediu diferit. Această comportare se datoreşte faptului că formarea fiecărui component celular este dirijată prin mecanisme de control care coordonează biosinteza în raport cu condiţiile mediului şi cu necesităţile vitale ale celulei şi, prin aceasta, asigură ordinea internă de care depinde o creştere echilibrată. Aceste mecanisme de control nu impun o schemă rigidă

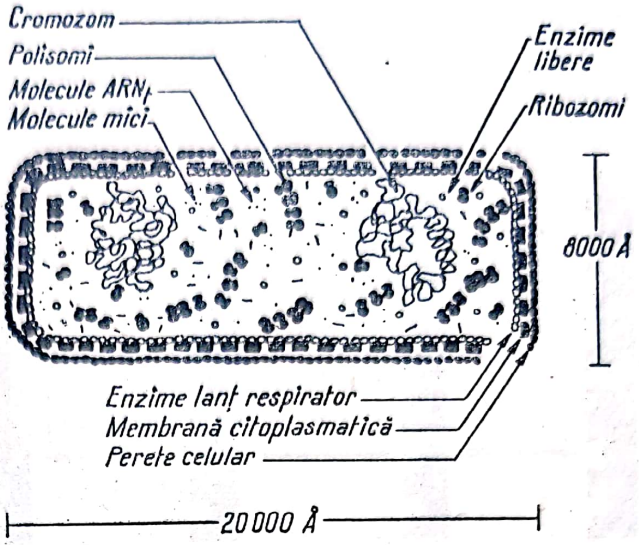


Fig. 148. Reprezentare schematică a raporturilor dintre diferiţii constituenţi chimici într-o celulă de *Escherichia coli* (după Watson).

de biosinteză, ci dimpotrivă, permit o desfăşurare suplă a diferitelor procese fiziologice în funcţie de condiţiile oferite de mediu în fiecare moment.

Datele cele mai numeroase privind compoziţia chimică a bacteriilor, considerată din punct de vedere calitativ şi cantitativ, au fost obţinute prin studiul analitic al *E. coli*, bacterie de aproximativ 500 de ori mai mică decît o celulă vegetală sau animală de mărime medie (Ø 10 μ). Pe baza datelor actuale se apreciază că o celulă de *E. coli* ar conţine între 3 000 şi 6 000 de tipuri de molecule diferite. Aproape jumătate din acest număr ar reprezenta molecule „mici" (cu greutate moleculară mică), dintre care unele sînt foarte simple, ca H_2O şi CO_2, iar altele mult mai complexe, constituind o adevărată rezervă de metaboliţi gata de folosire, cum ar fi zaharuri, cei 20 de aminoacizi naturali, acizi organici, nucleotide, esteri fosforici, coenzime etc. (în total sub 1.10^7 molecule); restul moleculelor ar consta din diferite macromolecule ca aproximativ 200 de tipuri de glucide complexe şi precursori de glucide, 50 de tipuri lipide, 10^6 molecule proteină (2—3 000 tipuri diferite), un tip de ADN, un număr mare de molecule ARN etc. (tab. 8).

Unele asemenea macromolecule, şi anume acelea care au în special rol de rezervă sau structural rezultă din asamblarea într-un agregat cu configuraţie liniară a unui număr mare de monomeri de tip uniform. Altele însă, cum sînt în special acizii nucleici şi proteinele, sînt polimeri neuniformi sau macromolecule *codificate*, alcătuiţi din 4 şi respectiv 20 de unităţi de construcţie (baze nucleare şi respectiv aminoacizi naturali) şi avînd un înalt grad de specificitate de structură. Formarea unor asemenea tipuri de polimeri implică existenţa unor mecanisme foarte eficiente şi sigure de alegere şi ordonare corectă într-o anumită succesiune (secvenţă) a subunităţilor şi se realizează sub control genetic, graţie intrării în acţiune a unei molecule care funcţionează ca matriţă sau „template".

Datorită nivelului lor superior de aranjare conform unei informaţii complexe, macromoleculele codificate pot fi considerate ca prezentînd o anumită

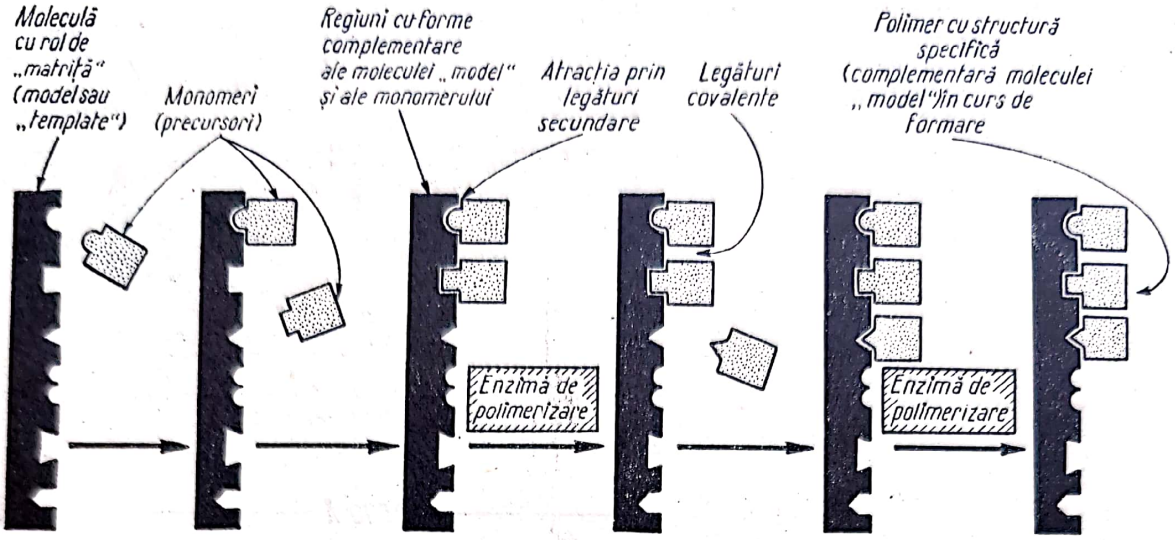


Fig. 149. Formarea unei macromolecule specifice de polimer prin aranjarea ordonată a monomerilor din constituția ei pe o suprafață acționînd ca matriță (model sau template) (după Watson).

specificitate, deci ca avînd o semnificație biologică foarte precisă, în sensul că sînt, la rîndul lor, purtătoare de informație.

În felul acesta, specificitatea biologică pare să fie bazată pe variații pe o temă comună, și anume pe aranjarea diferită a cîtorva unități fundamentale care se repetă într-o structură polimerică. După cum arată Watson, construcția polimerilor pornind de la monomeri, ca și utilizarea unor polimeri ca subunități pentru a forma polimeri și mai mari, reflectă un principiu general aplicat în construcția structurilor complexe vii și neanimate. Acest mod de construcție este mai simplu și mai sigur, deoarece permite reducerea efectelor unor greșeli de construcție prin îndepărtarea monomerilor „greșiți" de la încorporarea în polimerul final.

Pentru a exemplifica acest principiu, Watson arată că pentru constituirea unei macromolecule de 1 milion de atomi există două posibilități: fie construirea ei atom cu atom, fie sinteza prealabilă a 1 000 de unități mai mici (monomeri), fiecare a cîte 1 000 de atomi, urmată de asamblarea lor într-un polimer. Dacă se presupune că în procesul de sinteză, erorile care determină apariția unui produs nefuncțional se produc la întîmplare, inserarea unui alt atom decît cel adecvat avînd, de exemplu, o frecvență de 10^{-5}, rezultă că dacă se urmează prima schemă de construcție (atom cu atom), fiecare moleculă sintetizată va conține în medie 10 atomi „nepotriviți" și astfel practic nu se face sinteză de produși utili. Dacă însă biosinteza se face după cel de-al doilea model, erorile apar numai în 1% din subunități și ele sînt eliminate din polimerul final, grație specificității enzimelor care fac polimerizarea: aceste enzime nu „recunosc" monomerii nefuncționali din cauza erorii și nu îi încorporează în structura macromoleculei.

1. APA

Apa reprezintă cantitativ componentul cel mai important al celulei bacteriene (în medie 75—85% din greutatea umedă a masei celulare). Conţinutul în apă al microorganismelor poate fi dedus din diferenţa dintre valorile greutăţii lor apreciate în stare umedă şi după uscare la 100°. Apa se găseşte în celula bacteriană, fie în stare liberă în citoplasmă, fie ca apă „legată" prin forţe fizico-chimice de diferite componente celulare, inseparabilă de microstructura celulei. Apa îndeplineşte următoarele funcţii, absolut esenţiale pentru viaţa microorganismelor: *1)* se comportă ca solvent al diferiţilor constituenţi hidrosolubili şi ca mediu de dispersie al celorlalţi constituenţi chimici insolubili în apă; 2) condiţionează activitatea enzimelor şi, prin aceasta, face posibilă desfăşurarea reacţiilor de metabolism intermediar şi *3)* asigură transportul diferiţilor metaboliţi şi al produşilor de catabolism în celula bacteriană.

Scăderea conţinutului în apă liberă conferă bacteriilor o rezistenţă mărită la acţiunea temperaturii şi a substanţelor chimice, iar dincolo de anumite limite această scădere determină chiar întreruperea activităţii metabolice a celulei.

2. ACIZI NUCLEICI

În celula bacteriană, ADN se găseşte sub forma unei molecule unice dublu helicale, cu greutatea moleculară $2{,}5 \times 10^9$, neasociată cu proteine sau cu alte componente chimice înrudite, reprezentînd după Watson circa 1/5 din conţinutul celulei. Această cantitate fixă de ADN stabileşte prin ea însăşi o limită a numărului de proteine care se pot sintetiza într-o celulă bacteriană şi, implicit, o limită a numărului de molecule mici.

După calculele lui Watson, o proteină de mărime medie, conţinînd aproximativ 500 de aminoacizi, este codificată de o informaţie genetică înscrisă într-o secvenţă de 1 500 de perechi nucleotide. Ţinînd seama de faptul că greutatea moleculară a unei perechi de nucleotide este de 660, pentru codificarea fiecărei proteine este nevoie de un fragment de ADN cu greutate moleculară de $660 \times 1\,500 \cong 10^6$. În concluzie, numărul de proteine diferite care pot exista într-o bacterie nu poate depăşi valoarea raportului gr. mol. ADN/10^6. În sfîrşit, ţinînd seama de faptul că cele mai multe proteine au funcţii enzimatice şi că pentru metabolismul unei substanţe cu moleculă mică sînt necesare în medie una sau două enzime specifice, se poate aprecia numărul de tipuri diferite de molecule mici pe care le poate conţine o celulă.

ARN reprezintă aproximativ 10—20% (în medie 17%) din greutatea uscată a celulei şi se găseşte în citoplasmă sub trei forme foarte diferite sub raportul mărimii moleculei, al funcţiilor exercitate în celulă şi al secvenţei bazelor din structura lor. ARN *de mesaj* (ARN*m*), ARN *de transport* sau solubil (ARN*t* sau ARN*s*) şi ARN *ribozomal* (ARN*r*). ARN*m*, eterogen ca mărime şi compoziţie, reprezintă aproximativ 1% din ARN total şi este de aproximativ 1 000 de tipuri diferite. El are rolul de a transporta de la gene la ribosom informaţia necesară sintezei proteinelor. La bacterii, ARN*m* este

o moleculă „cu viaţă scurtă", care este degradată la circa 1—2 minute după ce a fost sintetizată. Datorită acestui fapt, celula bacteriană sintetizează aproximativ 12 500—25 000 molecule ARN*m* în timpul cît durează o generaţie.

ARN*t* sau ARN*s*, de cîte 1—4 tipuri corespunzătoare fiecăruia din cei 20 de aminoacizi naturali, are rolul de „adaptor" pentru fixarea aminoacizilor la matriţa de ARN*m* în cursul sintezei proteinelor. ARN*r*, descoperit în structura ribosomilor, are o funcţie însă insuficient descifrată.

3. PROTEINELE

Reprezintă în medie 60% die greutatea uscată a bacteriilor (respectiv circa 9×10^{10} daltoni) şi sînt reprezentate de circa 10^6 molecule de 2—3 000 de tipuri diferite. În afară de proteinele *simple*, în celula bacteriană se mai găsesc proteine *combinate* cu molecule neproteice, alcătuind heteroproteide şi cenapse (complexe glucidoproteice sau lipidoproteice). Cantitatea totală a proteinelor bacteriene variază puţin în raport cu starea fiziologică a celulei. Această constanţă se datoreşte probabil, pe de o parte, stabilităţii cantitative a proteinelor ei structurale, iar pe de altă parte echilibrului dinamic dintre mecanismele de reglare metabolică prin inducţie şi represie care asigură iniţierea sau blocarea sintezei proteinelor enzimatice în raport cu cerinţele fiziologice ale celulei şi cu condiţiile mediului ei de viaţă. În ceea ce priveşte însă natura proteinelor componente, diferenţele sînt foarte mari, numărul de molecule existente într-o bacterie pentru fiecare tip diferit de proteină putînd varia între 1 şi 105. Ca semnificaţie biologică, aproximativ jumătate din proteinele bacteriene funcţionează ca enzime, iar restul au rol structural.

4. GLUCIDELE

Totalizează 4—25% din greutatea celulelor bacteriene uscate. Ele sînt reprezentate prin glucide *simple* (mono şi dizaharide) şi prin *polizaharide*. Polizaharidele bacteriene provin fie din condensarea mai multor molecule de pentoze *(pentozani)* sau de hexoze *(hexozani)*, fie din polimerizarea unor hexoze, pentoze şi alţi compuşi *(polimeri micşti)*. Unele bacterii acumulează cantităţi mari de polizaharide în interiorul şi în jurul celulei, în special atunci cînd creşterea populaţiei bacteriene a fost oprită prin epuizarea unor anumiţi metaboliţi (în special cu N) dintr-un mediu care însă rămîne bogat în C şi energie. Semnificaţia lor biologică este diferită: glucidele simple iau parte la metabolismul intermediar al celulei, în timp ce polizaharidele au, după caz, rol plastic, energetic sau de material de rezervă.

Bacteriile nu conţin celuloză. Unele specii *(Acetobacter xylinum)* formează la suprafaţa culturilor, prin polimerizarea unui percursor monomeric liberat în mediu, microfibrile de celuloză bacteriană extracelulară care se întreţes înglobînd celulele pentru a forma o peliculă cu aspect de pîslă (Gibson, 1968).

5. LIPIDELE

Reprezintă 1—20% din greutatea bacteriilor uscate, cantitatea lor variind după specie, vîrsta culturii şi condiţiile de cultivare.

Lipidele bacteriene apar atît ca un component major al membranei citoplasmatice, cît şi sub formă de granule intracitoplasmatice. Formarea şi degradarea lor — în funcţie de condiţiile de mediu — sugerează că ele ar reprezenta un depozit de rezervă a atomilor de C sub formă de substanţe cu nivel energetic relativ înalt. Acumularea lipidelor în celulele bătrîne este considerată ca un semn de degenerescenţă. Din punct de vedere chimic, lipidele bacteriene pot fi *gliceride*, *fosfatide* şi *ceruri*. La multe specii, granulele lipidice intracitoplasmatice sînt formate din *poli-β-hidroxibutirat*. În timp ce în condiţii de creştere echilibrată acest compus se acumulează numai în cantităţi abia detectabile, în condiţii restrictive de dezvoltare a culturii (medii bogate în C şi energie, dar sărace în N), el se ecumulează în cantităţi mari. În momentul în care mediul este sărăcit în C sau în sursă de energie, poli-β-hidroxibutiratul este degradat mai întîi pe cale anaerobă, la β-hidroxibutirat şi acetoacetat, iar apoi pe cale aerobă la CO_2 şi H_2O.

6. SUBSTANŢELE MINERALE

Reprezintă 2—30% din greutatea uscată a bacteriilor şi sînt formate din P, K, Na, Ca, S, Cl, Fe, la care se adaugă în cantităţi mai mici şi alte elemente, cum sînt Cu, Mg, Zn. Cel mai bine reprezentat este P, 45% în medie, dar putînd ajunge la bacilul tuberculozei, pînă la 74% din greutatea totală a substanţelor minerale ale celulei. Aceste elemente se combină între ele pentru a forma compuşi anorganici sau intră în compoziţia unor substanţe organice. În funcţie de natura moleculei din care fac parte, ele se găsesc fie ca electroliţi în soluţie, fie legate sub formă de complexe coloidale (agregate de molecule suspendate într-un mediu apos). După Ghosh (1963), în celula bacteriană electroliţii s-ar găsi legaţi de proteinele citoplasmatice. Cînd acestea sînt metabolizate, ionii minerali rămîn în stare liberă pînă cînd se adsorb din nou pe alte proteine, nou sintetizate. Cantitatea de electroliţi în stare liberă este în raport cu volumul apei intracelulare nelegate, volum care, la rîndul său, variază în funcţie de starea funcţională a celulei. Constituenţii minerali au un rol deosebit de important în viaţa celulei bacteriene, prin aceea că: *1)* influenţează permeabilitatea peretelui celular, favorizînd schimburile dintre celulă şi mediu; *2)* contribuie la reglarea presiunii osmotice şi la menţinerea echilibrului de membrană; *3)* intră în compoziţia multor constituenţi celulari (rol plastic) şi a unor enzime; *4)* activează (Cu, Mg, Zn) unele sisteme enzimatice; *5)* contribuie la reglarea *p*H-ului şi a potenţialului de oxido-reducere.

Fosforul are o importanţă excepţională în metabolismul energetic bacterian, datorită capacităţii sale de a stoca în legături „macroergice" cantităţi foarte mari de energie care, la nevoie, este pusă la dispoziţia celulei pentru a fi uti-

Scanned with OKEN Scanner

lizată în diferite procese endergonice. Ca şi ceilalţi constituenţi celulari, compuşii minerali variază cantitativ şi calitativ cu specia, iar în cazul aceleiaşi specii, în funcţie de vîrsta culturii şi de compoziţia chimică a mediului (spre exemplu, celulele tinere conţin de 6—7 ori mai multe minerale decît cele bătrîne).

7. PIGMENŢII BACTERIENI

Elaboraţi de celulele speciilor cromogene, pigmenţii bacterieni sînt substanţe colorate care pot rămîne în interiorul celulelor, colorînd caracteristic coloniile, sau difuzează la exterior, colorînd mediul de cultură. În funcţie de *comportarea pigmentului* lor, microorganismele cromogene se împart în trei categorii: *1) microorganisme cromofore,* la care pigmentul rămîne la locul de sinteză fiind legat fizico-chimic de citoplasmă, de unde coloraţia specifică a celulei examinate în stare vie la microscop (de exemplu, *Rhodothiobacteriile); 2) microorganismele paracromofore,* la care pigmentul rămîne localizat în peretele celular sau în stratul mucos (de exemplu, stafilococul); *3) microorganismele cromopare,* al căror pigment este eliminat în mediu care, de aceea, se colorează caracteristic (de exemplu, *Pseudomonas aeruginosa).*

După natura lor chimică, pigmenţii pot fi împărţiţi în: *a) derivaţi pirolici* de tipul bacterioclorofilelor întîlnite la bacteriile fotosintetice; *b) pigmenţi fenazinici* ca pigmentul albastru produs de *Pseudomonas aeruginosa,* format, după Gessard, din piocianină (albastră) şi bacteriofluoresceină (galbenă-verzuie); *c) pigmenţi carotenoizi* (ca zeaxantina, luteina, licopenul etc.), de culoare roşie, galbenă sau portocalie, întîlniţi la micrococi; *d) pigmenţi chinoinici,* înrudiţi cu vitamina K, de culoare galbenă (la *Mycobacterium tuberculosis); e) pigmenţi antocianici* (la actinomicete din genul *Streptomyces*) şi *f) pigmenţi melanici* de culoare brună sau neagră (la *Azotobacter* sp.).

Semnificaţia biologică a celor mai mulţi pigmenţi bacterieni este încă necunoscută. Unii autori (Williams, 1956) consideră că cei mai mulţi dintre ei nu ar avea nici o semnificaţie funcţională şi, ca urmare, s-ar acumula în celulă şi în mediu întrucît nu sînt metabolizabili în continuare.

În realitate, datele experimentale pledează pentru o semnificaţie a pigmenţilor variabilă după natura lor chimică. Astfel, bacterioclorofilele au un rol esenţial şi direct în fotosinteză, în timp ce carotenoizii, atunci cînd se găsesc în cromatofori, participă numai indirect la acest proces, captînd energia luminoasă pentru a o ceda clorofilelor. Pigmenţii carotenoizi ai bacteriilor care nu sînt capabile de fotosinteză au rolul de a proteja celula faţă de radiaţiile luminoase şi mai ales faţă de razele ultraviolete. Aceasta explică sensibilitatea diferită a bacteriilor faţă de aceste radiaţii în raport cu natura şi culoarea pigmentului pe care-l produc: în timp ce bacteriile cu pigment verde au o sensibilitate identică aceleia a bacteriilor acromogene, cele care sintetizează pigmenţi carotenoizi sînt protejate cu eficacitate maximă de pigmenţii galbeni şi mai slab, în ordine, de cei roz şi cei portocalii (Steuer, 1957).

Alţi pigmenţi se comportă ca vitamine cu acţiune beneficială, fie pentru bacteria producătoare, aşa cum sînt flavoproteina lui *L. delbrueckii* (cu acţiune

vitaminică de tip B_2) și ftiocolul lui *Myc. phlei* (cu acțiune vitaminică de tip K), fie pentru organismul gazdă al acesteia, așa cum este cazul unor pigmenți (precursori ai vitaminei B_6) elaborați de specii din microflora intestinală. În sfîrșit, unii pigmenți ca piocianina, ftiocolul și violaceina au o evidentă activitate antibiotică față de alte microorganisme.

Pigmentogeneza constituie un criteriu important de identificare a unor specii de microorganisme. Astfel, în funcție de acest criteriu se disting în genul *Staphylococcus* trei specii: *S. albus* (achromogen), *S. aureus* (cu colonii galbene-aurii) și *S. citreus* (cu colonii colorate în galben-citrin), iar în cadrul genului *Sarcina* se diferențiază, după culoarea portocalie și respectiv galbenă a coloniilor, speciile *S. aurantiaca* și *S. lutea.*

8. ECHIPAMENTUL ENZIMATIC

Biocatalizatori organici elaborați de celula vie, enzimele sînt caracterizate prin specificitatea lor în raport cu substratul — moleculele asupra cărora acționează — și prin comportarea lor ca acceleratori ai unor reacții implicînd formarea sau desfacerea unei anumite legături covalente din structura substratului lor. O dată reacția desăvîrșită, enzima se eliberează pentru a se adsorbi pe o nouă moleculă de substrat, fiind capabilă să catalizeze astfel pînă la 10^6 reacții specifice pe minut.

Din punct de vedere chimic, enzimele bacteriene sînt fie proteine *simple*, fie proteine *conjugate*. În acest din urmă caz, enzima activă *(holoenzima)* este formată din două componente, inactive atunci cînd sînt separate, și anume: *apoenzima* — proteina care determină specificitatea reacției enzimatice — și *coenzima*, un compus termostabil organic sau anorganic. În funcție de raportul lor cu celula în care s-au format, enzimele bacteriene se împart în două categorii: *1) enzime extracelulare (exoenzime)*, în general hidrolaze, care sînt de obicei eliberate în mediu și *2) enzime intracelulare (endoenzime)*, care rămîn în celulă. La rîndul lor, enzimele intracelulare aparțin la două subtipuri: *a) enzime solubile*, localizate la nivelul structurilor de suprafață ale celulei, de unde sînt eliberate cu ușurință în urma distrugerii acesteia sub acțiunea ultrasunetelor sau a abrazivilor (și ca atare pot fi obținute în stare pură) și *b) enzime „particulate"*, legate de constituenți insolubili ai celulei ca membrana citoplasmatică și diverticulii ei (mezozomii), cromatoforii etc.; în această ultimă categorie intră enzimele metabolismului energetic și cele ale aparatului fotosintetizant care rămîn, după dezintegrarea celulei, legate de resturile celulare (P o l l o c k, 1963).

În ceea ce privește eliberarea enzimelor din celula bacteriană, s-au propus mai multe explicații. Enzimele s-ar forma la nivelul unor polisomi foarte apropiați de membrana citoplasmatică sau chiar la nivelul acestei structuri și ar difuza prin peretele celular spre exterior, pe măsură ce sînt sintetizate sau ulterior, fără să se fi aflat însă în prealabil libere în citoplasmă. Difuzarea exoenzimelor ar fi favorizată de faptul că ele sînt proteine relativ mici, cu puține legături disulfidice încrucișate sau chiar fără asemenea legături și, ca

atare, ar fi lipsite de rigiditate, particularitate care ar permite liberarea lor din celulă în urma unor infime alterări celulare, compatibile cu creşterea şi reproducerea normală a celulelor. În sfîrşit, în anumite cazuri prezenţa exoenzimelor în mediu s-ar datora fie scurgerii lor din celulele bacteriene moarte, al căror perete şi-a pierdut permeabilitatea selectivă caracteristică organismelor vii, fie eliberării lor prin autoliza celulei bacteriene.

Capacitatea celulei bacteriene de a-şi elabora constituenţii echipamentului enzimatic este determinată genetic. Ca urmare, numărul tipurilor de enzime pe care le poate sintetiza o bacterie este limitat de numărul determinanţilor genetici incluşi în genomul său, care ar fi, în medie, de circa 2 000. Dimensiunile mici ale celulei bacteriene limitează, la rîndul lor, numărul total al moleculelor de enzimă la maximum un milion.

Pentru realizarea adecvată a metabolismului său, celula bacteriană dispune de mecanisme de reglare care ajustează în fiecare moment setul de enzime în activitate, ca şi cantitatea relativă din fiecare enzimă, în raport cu nevoile celulei şi ca răspuns la variaţiile mediului extern. Astfel, cele mai multe enzime implicate în catabolism sînt sintetizate numai în prezenţa substratului lor în mediu *(enzime inductibile)*, în timp ce altele sînt elaborate independent de constituţia chimică a mediului nutritiv *(enzime constitutive)*.

Scanned with OKEN Scanner

METABOLISMUL BACTERIAN

Celula bacteriană, ca orice organism viu, este un sistem specific, complex organizat, dotat cu continuitate genetică, deci cu capacitatea de a se reproduce în mod independent. În cazul în care este aprovizionată cu hrană, ea îşi sintetizează constituenţii proprii, folosind pentru aceasta energia eliberată din degradarea enzimatică a substratului ei nutritiv. Prin urmare, bacteriile sînt capabile de o activitate fiziologică neîntreruptă, mai mult sau mai puţin intensă, în cursul căreia cresc, se divid şi îşi modifică structura, compoziţia chimică, poziţia în mediu etc. Continuitatea acestor activităţi necesită prezenţa în mediul înconjurător a unor substanţe utilizabile în nutriţie pentru sinteza constituenţilor celulari şi procurarea energiei indispensabile fenomenelor vitale.

Metabolismul bacterian reprezintă totalitatea reacţiilor biochimice implicate în activitatea biologică a celulei bacteriene, prin intermediul cărora energia şi elementele biogene ca atare sau sub formă de combinaţii mai mult sau mai puţin complexe sînt preluate din mediu şi utilizate pentru biosinteză şi creştere, ca şi pentru alte diferite activităţi fiziologice secundare (mobilitate, luminescenţă etc.). Graţie acestor reacţii, substanţele din mediu sînt transformate în constituenţi celulari, energie şi produşi de uzură. După cum reacţiile metabolice sînt însoţite de eliberare sau de consum de energie, ele sînt de două tipuri, reprezentînd două feluri de căi metabolice, adică de secvenţe de reacţii chimice catalizate enzimatic: *a*) reacţii prin care se eliberează energie (*exotermice* sau *exergonice*), corespunzînd catabolismului sau proceselor de *dezasimilare*, prin care se liberează energie în urma degradării enzimatice a unor substanţe nutritive din mediu; *b*) reacţii prin care se consumă energie (reacţii *endotermice* sau *endergonice*), corespunzînd anabolismului sau proceselor de *asimilare*, în care energia este folosită pentru sinteza de constituenţi celulari.

Aceste două tipuri de reacţii sînt strîns interconectate, astfel încît degradarea substanţelor nutritive care furnizează energia asigură în acelaşi timp şi aprovizionarea celulei cu blocuri de construcţie chimică sau precursori ai lor, în vederea realizării biosintezei prin asamblarea lor sub formă de macromolecule proprii celulei. Datorită acestei particularităţi funcţionale, căile centrale ale metabolismului celular sînt denumite *căi amfibolice* (D a v i s, 1961).

În ansamblu, diferitele reacţii ale metabolismului îndeplinesc patru funcţii esenţiale pentru viaţa celulei, şi anume: *1*) producerea subunităţilor folosite pentru construcţia constituenţilor celulari pornind de la substanţele nutritive;

2) liberarea de energie şi stocarea ei sub formă de ATP şi alţi compuşi macroergici; 3) activarea subunităţilor de construcţie monomere pe seama energiei de legătură din compuşii macroergici; 4) formarea constituenţilor celulari macromoleculari prin polimerizarea monomerilor, proces care în unele cazuri (proteine, acizi nucleici, unele polizaharide) decurge conform schemei de programare specifică reprezentată de informaţia genetică a celulei.

Una dintre caracteristicile distinctive ale activităţilor metabolice microbiene este intensitatea lor excepţională comparativ cu aceea a activităţilor omologe ale organismelor superioare. Astfel, activitatea respiratorie a unui gram (raportat la greutatea uscată) de bacterii aerobe este de cîteva sute de ori mai intensă decît aceea a omului, iar potenţialul metabolic al microorganismelor din cei 25 cm superficiali ai solului de pe o suprafaţă de un hectar este echivalent cu acela al cîtorva zeci de mii de oameni. După datele lui Burchard, 1 g de celule de *Micrococcus ureae* descompune 180—1 200 g uree pe oră, iar după Haecke, 1 g de bacterii lactice hidrolizează circa 178—14 890 g lactoză pe oră. Chiar dacă aceste date sînt aproximative, ele ilustrează capacitatea metabolică imensă a acestor vieţuitoare caracterizate, în plus, printr-o aptitudine cu totul deosebită de a supravieţui în condiţii de viaţă foarte variate. Pentru a atinge un asemenea nivel de activitate metabolică, organismul uman ar avea nevoie de mai multe mii de tone de alimente pe oră. O atare intensitate a activităţii biologice, puţin comună în lumea vie, este posibilă în bună parte datorită suprafeţei foarte mari a celulelor microbiene în raport cu greutatea lor. Ca urmare, aceste organisme au o suprafaţă foarte largă de contact cu mediul înconjurător, deci de schimb de substanţe între celulă şi mediu, precum şi o serie de proprietăţi fizico-chimice caracteristice sistemelor coloidale. Pe de altă parte, în natură ar exista, după Stanier, o regulă conform căreia viteza metabolismului, de care depinde viteza creşterii, ar fi invers proporţională cu mărimea organismului. Ca atare, cu cît corpul unui organism este mai mic cu atît metabolismul său este mai intens şi creşterea sa mai rapidă.

Excepţionala viteză de creştere a bacteriilor reprezintă un avantaj biologic important pentru supravieţuirea populaţiilor bacteriene în natură şi, în acelaşi timp, constituie factorul principal care condiţionează dimensiunile mici ale celulei bacteriene.

Iniţial, s-a considerat în mod eronat — pe baza relativei simplităţi a structurii celulare bacteriene — că activităţile biochimice ale bacteriilor ar fi în mod corespunzător rudimentare. Cercetările moderne de biochimie au demonstrat că bacteriile îşi realizează diferitele activităţi metabolice prin mecanisme similare sau, uneori, chiar mai complexe decît acelea implicate în metabolismul organismelor superioare. Capacităţile lor de sinteză sînt neobişnuit de mari, mergînd pînă la formarea tuturor constituenţilor celulari prin procese complexe care pot avea ca punct de plecare chiar compuşi anorganici ai C şi N. Multiplicitatea reacţiilor, simplitatea şi variabilitatea foarte largă a exigenţelor nutritive, numărul mare de substanţe asimilabile şi deosebita varietate a produşilor finali sînt dovezi ale unei remarcabile flexibilităţi fizio-

logice şi ar atesta, după Burrows, şi caracterul primitiv al unor astfel de forme de viaţă care nu au suferit modificările survenite în cursul evoluţiei la celulele diferenţiate ale organismelor superioare.

Considerate în ansamblu, bacteriile sînt organismele cele mai tipic omnivore dintre toate cele cunoscute, deoarece îşi pot realiza metabolismul folosind foarte numeroase şi diferite surse de substanţe nutritive, de la N molecular, CO_2, S şi pînă la substanţele organice complexe. Aproape orice substanţă din mediu, organică sau anorganică, din care se poate obţine energie, este accesibilă metabolismului bacterian. Există microorganisme care, pentru sinteza constituenţilor celulari, pot folosi substanţe lipsite de orice înrudire structurală cu componentele chimice ale celulei sau care sînt chiar toxice, substanţe şi materiale care acoperă o gamă largă de complexitate chimică, începînd de la acizii formic, oxalic şi sulfuric şi pînă la fenoli, asfalt, parafine, petrol, chitină, piele, cauciuc, lemn şi substanţe antibiotice. În lumea bacteriilor există însă şi mari diferenţe individuale sub acest raport, în sensul că unele specii, ca *Pseudomonas fluorescens*, pot metaboliza peste 200 de substanţe organice naturale, în timp ce altele, ca de exemplu *Nitrosomonas* sp., utilizează numai NH_3 şi O_2. Aceste particularităţi ale metabolismului microbian explică de altfel şi faptul că diferitele substanţe organice provenite din materiale reziduale şi din cadavre au fost degradate încă de la apariţia vieţii pe pămînt şi astfel nu s-au putut acumula. Diferitele grupuri sistematice de bacterii se caracterizează însă prin anumite particularităţi metabolice, în aşa fel încît, în afara unor alimente folosite de toate microorganismele (apă, CO_2, săruri minerale etc.), unele specii sau grupuri fiziologice de specii au nevoie şi de anumite substanţe nutritive specifice, indispensabile pentru realizarea metabolismului lor celular.

Exigenţele nutritive ale bacteriilor. Metabolismul bacterian este condiţionat de prezenţa în mediul natural sau în mediile de cultură artificiale a tuturor materialelor necesare speciei date pentru sinteza constituenţilor celulari şi pentru obţinerea de energie. De aceea, mediile de cultură trebuie să conţină într-o formă organică sau minerală, calitativ şi cantitativ corespunzătoare — în sensul de a fi adecvată tipului de nutriţie respectiv — toate elementele prezente în constituţia celulei bacteriene. Aşadar, în mediile uzuale trebuie să se găsească în primul rînd surse de C, H, O, N, P, S, apoi — în cantităţi mai mici — surse de K, Mg, Mn, Ca, Fe, Cl, sulfat, fosfat etc. şi, în sfîrşit, în concentraţii infime, Zn, Cu, Mo, aşa-numitele *oligoelemente*, care sînt indispensabile pentru activitatea catalitică a enzimelor.

Pătrunderea substanţelor nutritive în celula bacteriană. Peretele celular destul de „poros" al bacteriilor nu constituie o barieră în calea substanţelor hrănitoare din mediu, cu excepţia celor insolubile sau care se prezintă sub formă de particule. Substanţele nutritive care nu pot pătrunde ca atare în celulă sînt, în schimb, susceptibile de a fi degradate chiar în mediul extracelular sub acţiunea enzimelor microbiene localizate la suprafaţa celulei. O dată trecute de peretele bacterian, cele mai multe dintre aceste substanţe mai au însă de străbătut membrana citoplasmatică de natură lipoproteică. Unii compuşi pot s-o traverseze printr-un mecanism nespecific, aşa cum se întîmplă

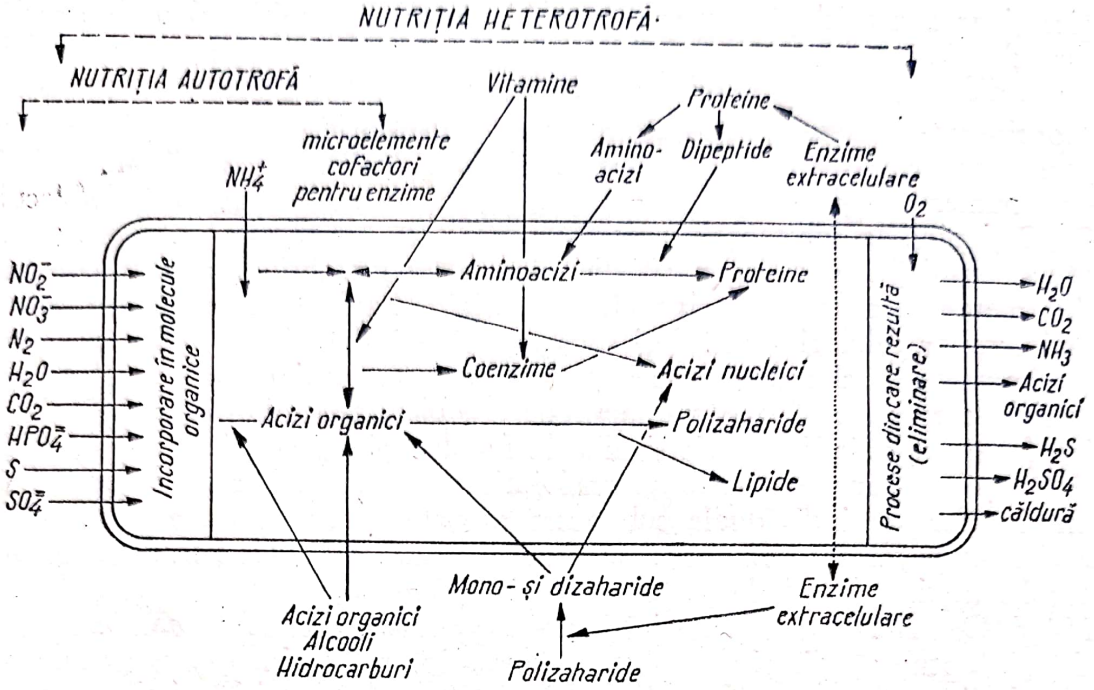


Fig. 150. Diferitele substanțe utilizate de bacterii și rolul lor în metabolism. Cadrul reprezintă schematic celula bacteriană și delimitează procesele care au loc intracelular (după Lamanna).

cu solvenții lipidelor și cu moleculele cu lanț lung care se „strecoară" prin „porii" rețelei lipoproteice. În cele mai multe cazuri însă, pătrunderea în celulă a substanțelor nutritive poate avea loc numai printr-un fenomen de transport selectiv, care implică o activitate metabolică celulară, deoarece se realizează prin legarea prealabilă a moleculei care urmează să intre în celulă de unele suprafețe combinante specifice de la nivelul membranei citoplasmatice. Transportul specific prin membrana citoplasmatică se poate face în mod pasiv printr-un proces de difuziune atunci cînd concentrația externă a substanței de transportat este mai mare decît concentrația ei internă. Cînd însă acumularea de substanțe în celule se face contra unui gradient de concentrație, este indispensabil un transport activ, care poate mări concentrația internă a substanței respective de cîteva sute de ori în raport cu aceea în care ea se găsește în mediu. Transportul activ necesită consum de energie și intervenția unor enzime — permeazele — care asigură pătrunderea în celulă a anumitor substraturi specifice (de exemplu β-galactozid-permeaza *E. coli* catalizează transportul activ al β-galactozidelor).

Procesele de degradare a substratului nutritiv la bacterii. Energia necesară biosintezei constituenților celulari se obține prin reacțiile catabolice de degradare a unor substanțe, care în cazul organismelor heterotrofe, sînt compuși organici cu structură complexă. Căile catabolismului la microorganisme sînt foarte numeroase și uneori specifice. Complexitatea și numărul lor la microorganismele heterotrofe variază ca urmare a gradului diferit de complexitate a macro-

moleculelor de origine biologică folosite ca sursă de C. Întotdeauna însă liberarea de energie prin procese de catabolism se realizează în trei faze distincte (Krebs şi Kornberger, 1965).

În prima fază a catabolismului macromoleculele sînt descompuse pe cale enzimatică la unităţile lor de construcţie: proteinele la aminoacizi, grăsimile la glicerol şi acizi graşi, iar glucidele la hexoze. În această fază se liberează de obicei mai puţin de 1% din energia totală a macromoleculelor, care însă nu este în totalitate utilizată de celulă, ci se pierde în bună parte sub formă de căldură. În a doua fază, diferitele molecule rezultate din descompunerea efectuată în faza precedentă sînt degradate mai departe în mod incomplet, cu liberarea unei treimi din energia lor totală şi cu formarea de CO_2, H_2O şi a numeroşi alţi produşi diferiţi (circa 2—300 la *E. coli* şi, probabil, un număr mult superior la bacteriile care pot degrada multe substanţe de natură diferită). Aceşti produşi reprezintă cu toţii intermediari ai căilor metabolice centrale. Cea de-a treia fază a procesului de liberare a energiei se realizează pe două căi: *a*) la microorganismele care pot descompune integral substanţele nutritive, pînă la CO_2 şi H_2O, procesul final se desfăşoară pe calea ciclului acizilor tri-

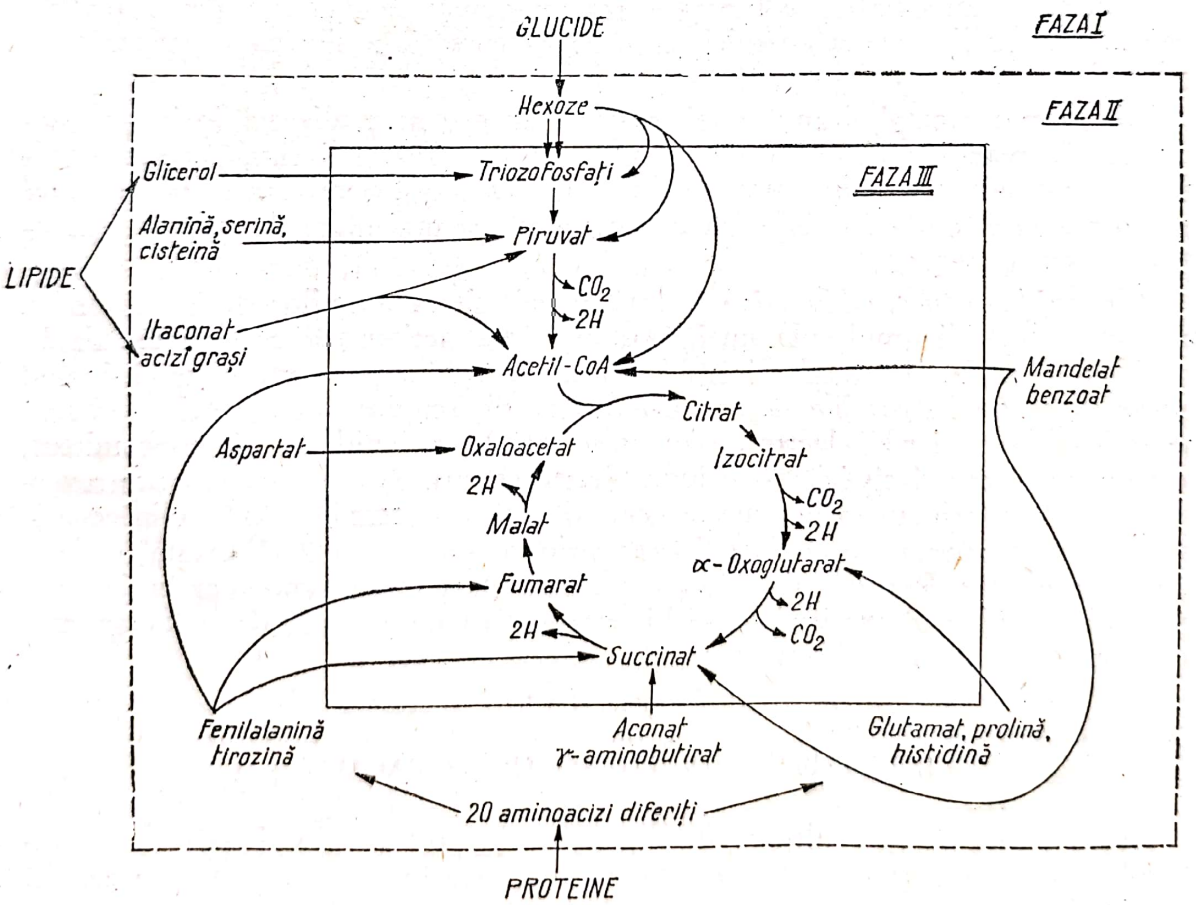


Fig. 151. Cele trei faze ale proceselor de degradare în cursul metabolismului bacterian (după Krebs şi Kornberg).

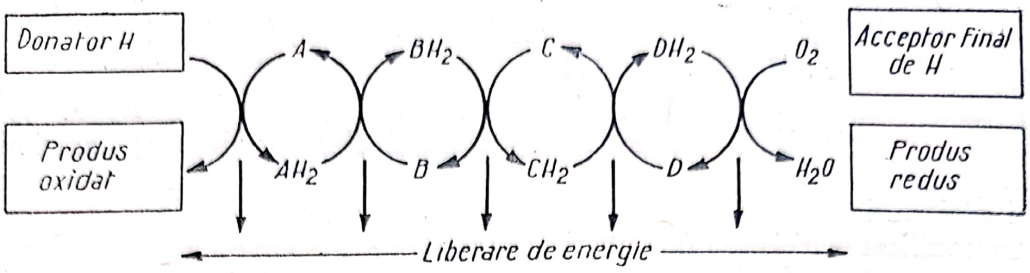


Fig. 152. Reprezentare schematică a procesului de liberare treptată a energiei, printr-o serie de oxidoreduceri consecutive de-a lungul catenei de respiraţie celulară la microorganisme.

carboxilici; *b*) la microorganismele care realizează numai o descompunere parţială a substratului lor nutritiv, liberarea de energie este mult mai slabă şi rezultă din reacţii de fermentaţie în care produşii căilor catabolice servesc — direct sau indirect — ca acceptori sau donatori de H în reacţii cuplate de oxido-reducere.

Produşii căilor catabolice funcţionează nu numai ca metaboliţi intermediari în reacţiile de liberare a energiei, ci şi ca precursori în sinteza constituenţilor celulari.

Prin urmare, catabolismul unui substrat exogen se realizează printr-o succesiune de reacţii enzimatice, dintre care cele din faza lui finală, corespunzătoare procesului de respiraţie celulară care se desfăşoară prin *mecanismul oxido-reducerii biologice*, eliberează cantitatea cea mai mare de energie utilizabilă pentru celulă.

Prin *oxido-reducere biologică* se înţelege pierderea atomilor de H (respectiv a electronilor) din molecula unei substanţe care acţionează ca donator de H sau electroni (*D*) şi transferul lor la molecula unei alte substanţe funcţionînd ca acceptor (*A*). Reacţiile de oxido-reducere sînt cuplate în aşa fel încît substratul *D* care pierde electroni sau atomi de H se oxidează şi, concomitent, acceptorul *A* care-i cîştigă, se reduce. Aceste reacţii, care au un caracter reversibil, pot fi exprimate prin ecuaţia generală $DH_2 + A \rightleftharpoons D + AH_2$. Din ecuaţie se vede că oxidarea, care se realizează prin sustragerea a 2 (H), este în fond o dehidrogenare. Procesul nu se realizează spontan, ci necesită intervenţia unor catalizatori celulari specifici — dehidrazele. Reacţia inversă de reducere este, bineînţeles, un proces de hidrogenare.

1. METABOLISMUL ENERGETIC LA BACTERII

După natura acceptorului final de H, s-au descris trei tipuri de procese metabolice de acest fel: *1) respiraţia*, după denumirea mai veche *respiraţia aerobă* sau, mai corect, *oxibiotică*, în care acceptorul final de H este oxigenul molecular; *2) respiraţia anaerobă* sau *anoxibiotică*, în care acceptorul final de H poate fi orice substanţă anorganică, exceptînd O_2; *3) fermentaţia*, orice proces de

oxido-reducere biologică producător de energie în care acceptorul final de electroni este un compus organic.

Întrucît oxidarea biologică pune final în libertate o mare cantitate de energie, utilizarea în condiţii optime a acestui mecanism de respiraţie celulară este asigurată prin două procese cu importanţă fundamentală: *a*) eliberarea sub formă fracţionată a energiei; *b*) stocarea excesului de energie în vederea unei utilizări ulterioare.

Eliberarea fracţionată a energiei. Spre deosebire de combustie, în care liberarea de energie este brutală, în procesele de oxido-reducere biologică acest fenomen se desfăşoară în mai multe etape, ceea ce determină o degajare succesivă, pe fracţiuni, a energiei totale susceptibilă de a fi pusă în libertate. Aceasta se datoreşte faptului că respiraţia celulară se realizează prin intermediul a o serie de oxido-reduceri succesive — catalizate de enzimele respiratorii alcătuind *sistemul transportor de electroni* sau *catena de respiraţie celulară* — în cursul cărora atomii de H sînt transportaţi la substratul acceptor pe calea unui întreg lanţ de reacţii cuplate. Desfăşurarea succesivă a reacţiilor de oxidoreducere asigură, pe de o parte, o degradare fracţionată şi ordonată a substanţelor organice nutritive cu formarea de compuşi intermediari care servesc ca material pentru reacţiile de biosinteză, iar pe de altă parte, face utilizabilă pentru biosinteze o parte din energia liberată prin oxidare. Catena de respiraţie celulară funcţionează prin acţiunea mai multor enzime — *dehidrazele* — active în prezenţa unor coenzime care servesc ca acceptori tranzitorii de (H) de la un substrat donator la un altul acceptor. Transferul de electroni efectuat iniţial de la substratul donator de hidrogen (DH_2) la acceptorul *A* este continuat, sub acţiunea altor coenzime, spre acceptorul *B* şi aşa mai departe, pînă la acceptorul final reprezentat, în cazul respiraţiei aerobe, de O_2.

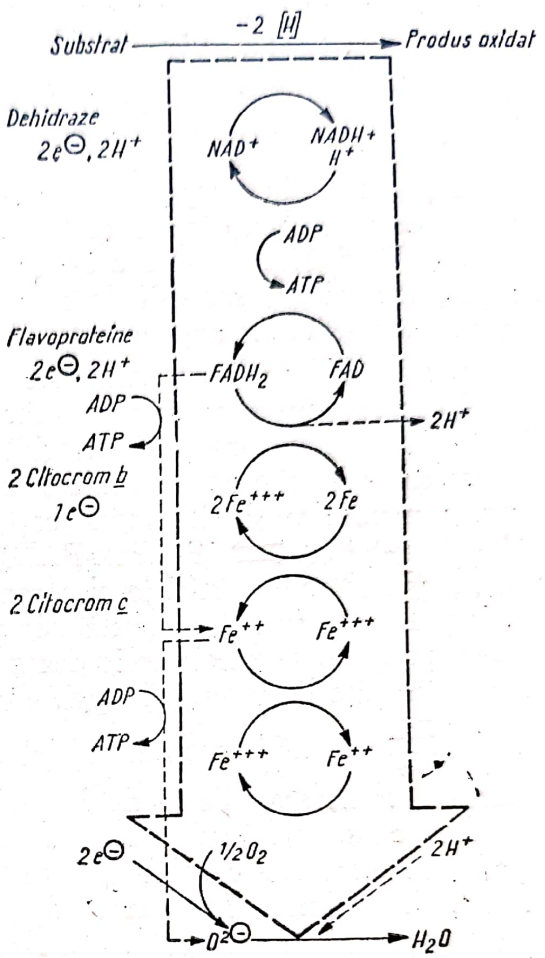


Fig. 153. Reprezentare schematică a sistemului transportor de electroni. Pentru simplificare, s-a redat numai secvenţa generală a reacţiilor, omiţîndu-se intrările colaterale posibile pe această catenă.

În funcţie de structura chimică a coenzimelor şi de ordinea în care ele intră în acţiunea de-a lungul catenei de respiraţie celulară, dehidrazele se încadrează în trei grupuri de enzime respiratorii.

Grupul dehidrazelor piridinice este format de enzimele ale căror coenzime sînt NAD (nicotin-adenin-dinucleotid) şi NADP (nicotin-adenin-dinucleotid trifosfat). Fracţiunea activă a acestor coenzime este *nicotinamida,* ai cărei nuclei piridinici se pot găsi sub două forme alternative: oxidată (NAD şi NADP) şi redusă ($NADH_2$ şi $NADPH_2$). Reacţia dintre un substrat oxidabil şi o coenzimă din grupul nicotin-adenin-dinucleotidelor constă din dehidrogenarea sau oxidarea celui dintîi şi hidrogenarea, deci reducerea coenzimei. Cum NAD şi NADP sînt uşor disociabile de apoenzimele lor, fiecare dintre ele poate participa succesiv la numeroase reacţii de oxido-reducere, după cuplarea lor cu diferite apoenzime.

Grupul dehidrazelor flavinice este reprezentat de enzime respiratorii flavoproteice care conţin o grupare prostetică solid fixată (cofactor), reprezentată fie de FMN (flavin-mono-nucleotid), fie de FAD [1] (flavin-adenin-dinucleotid). La bacteriile aerobe aceste enzime joacă rolul de transportori de H între dehidrazele piridinice şi citocromi, cel de-al treilea grup de enzime respiratorii: $SH_2 + Enz\text{-}FAD \rightleftharpoons S + Enz\text{-}FADH_2$ după care $FADH_2$ este reoxidat printr-un transfer de electroni la citocromi.

Sistemul citocromilor constă dintr-o serie de proteine conjugate conţinînd fiecare un grup prostetic solid fixat, numit *hem,* în care Fe poate fi oxidat şi redus în mod reversibil prin cîştigarea sau pierderea unui electron: $Fe^{+++} \underset{-e}{\overset{+e}{\rightleftharpoons}} Fe^{++}$. Citocromul iniţial din acest sistem acceptă unul cîte unul electronii transferaţi de la dehidraze şi îi transferă pe rînd, mai departe, altui citocrom care, la rîndul său, efectuează un transfer similar, astfel încît transportul de electroni continuă în acelaşi mod de-a lungul unui întreg lanţ de citocromi. Ultimul citocrom al sistemului transferă fiecare electron la acceptorul unic final constînd din O_2. Acest transfer final este efectuat de o enzimă specială, *citocromoxidaza.* Cînd Fe sub formă redusă (Fe^{++}) din hemul ultimului citocrom este reoxidat (Fe^{+++}) sub acţiunea citocromoxidazei, oxigenul molecular este redus şi se transformă în ionul O^{--} capabil de a se uni cu protonii (H^+) din mediul celular pentru a forma H_2O. Sistemul citocromic care catalizează reacţiile reprezentînd treptele terminale ale lanţului de transport al electronilor este bine reprezentat la bacteriile aerobe, cum sînt, de exemplu, *B. subtilis, B. anthracis,* care au citocromi de tipurile *a*, a_3, *b*, *c* şi c_1. Bacteriile facultativ anaerobe au numai unul sau doi citocromi, iar anaerobele stricte sînt complet lipsite de citocromi şi, ca atare, nu au nici activitate citocromoxidazică.

În cursul metabolismului celular — în funcţie de natura substratului şi de enzimele prezente în celulă — sînt folosite diferite combinaţii de acceptori tranzitorii de H de-a lungul lanţului de respiraţie celulară.

Stocarea energiei suplimentare. Al doilea proces cu importanţă fundamentală pentru economia respiraţiei celulare este acela prin care energia suplimentară, eliberată din reacţiile de oxido-reducere, nu se pierde, ci este depozitată

[1] Cofactorul diferă de coenzimă prin aceea că el funcţionează unitar cu molecula de enzimă, nefiind disociabil, aşa cum este coenzima.

Scanned with OKEN Scanner

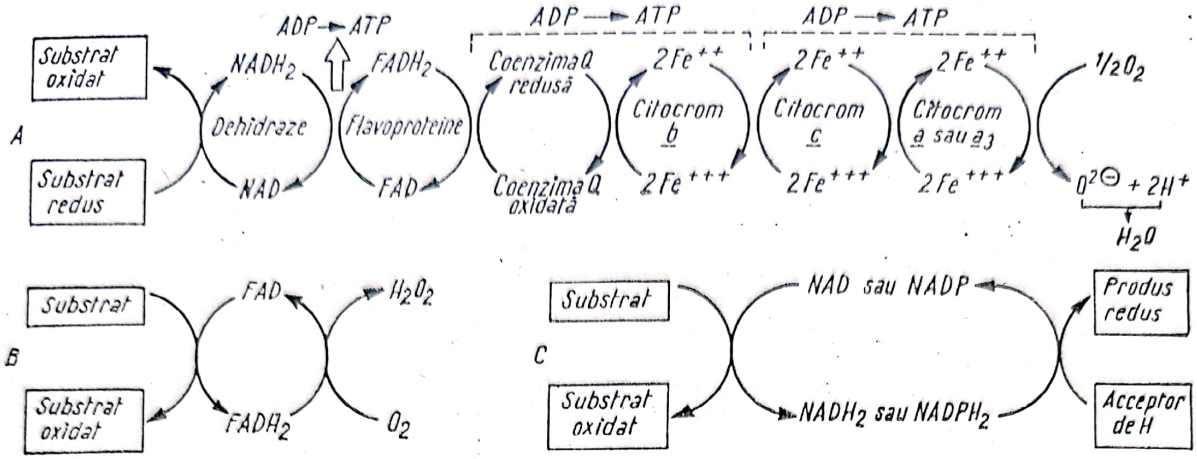


Fig. 154. Reprezentare schematică a modului diferite de folosire a transportorilor de electroni în cursul metabolismului bacterian:

A — reacţii de oxidoreducere întîlnite la bacterii aerobe care utilizează o serie completă de transportori de electroni; *B* — metabolism aerob cu utilizarea exclusivă a flavinei ca transportor intermediar; *C* — transportul de electroni în procesele fermentative, realizat de obicei de un singur transportor (NAD sau NADP).

într-un produs special din care, la nevoie, ea poate fi eliberată cu uşurinţă. Această acumulare de energie se realizează printr-o serie de procese, graţie cărora energia pusă în libertate de reacţiile de oxido-reducere ale catenei de respiraţie celulară este înmagazinată într-un compus organic cu fosfor sub forma unei legături intens energetice numită *legătură macroergică* şi reprezentată în chimie prin simbolul ~.

Compusul macroergic astfel rezultat este acidul adenozintrifosforic (ATP) care derivă, prin două fosforilări consecutive, de la acidul adenozinmonofosforic (AMP). Dacă în molecula AMP se introduce, prin oxidare biologică, o moleculă de fosfat anorganic (*Pi*), aceasta se leagă de gruparea fosfat a AMP printr-o legătură macroergică şi astfel rezultă primul compus macroergic — acidul adenozin-difosforic (ADP~) — care, la rîndul său, se poate transforma printr-o nouă fosforilare oxidativă în cel de-al doilea compus macroergic — acidul adenozintrifosforic (ATP ~~) — care posedă două legături ~ şi, ca atare, înmagazinează o şi mai mare cantitate de energie. Atît ATP cît şi ADP pot ceda cu uşurinţă fosforul şi, în acest caz, legătura macroergică ~ se rupe, iar energia ei latentă devine accesibilă consumului pentru diferitele nevoi ale celulei. Utilizarea radicalilor fosforici puternic energetici reprezintă o modalitate foarte importantă de obţinere a energiei necesare reacţiilor de biosinteză. ADP şi ATP constituie deci inelul de legătură între reacţiile oxidative producătoare de energie şi cele de sinteză care necesită energie, după cum reiese din schema:

$$\left.\begin{array}{c}\textit{Oxidări}\ \text{(eliberare de energie)}\\ \text{Furnizare de} \sim \text{P}\end{array}\right] \quad \text{ADP} \underset{-\sim \text{P}}{\overset{+\sim \text{P}}{\rightleftarrows}} \text{ATP} \quad \left[\begin{array}{c}\textit{Sinteze}\ \text{(necesită energie)}\\ \text{Consum de} \sim \text{P}\end{array}\right.$$

Mecanismele de producere a ATP. Microorganismele chimiosintetizante îşi obţin energia necesară producerii de ATP din reacţii de oxido-reducere, pro-

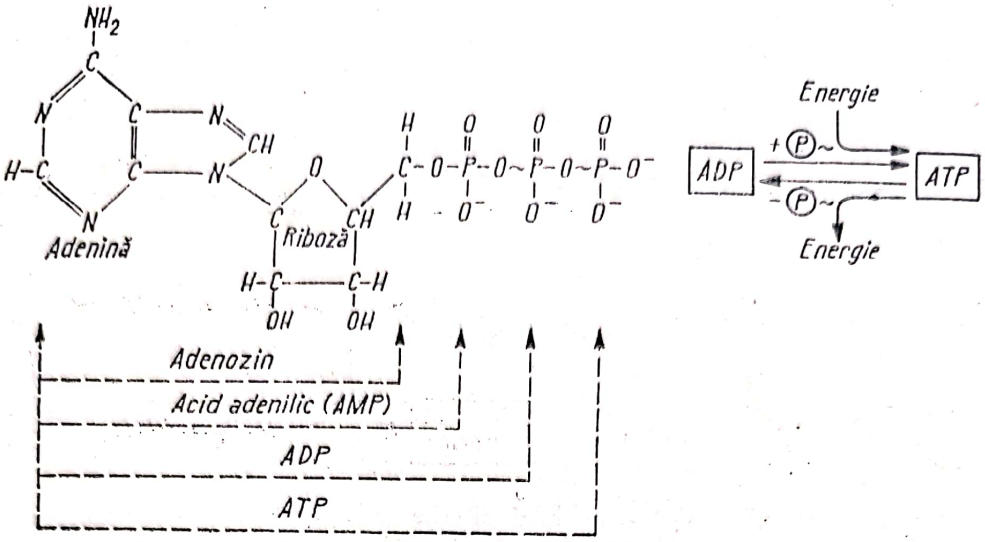


Fig. 155. Structura chimică a ATP şi reprezentarea schematică a reacţiei ADP ⇌ ATP.

ducătoare de energie. Modalitatea cea mai importantă prin care se realizează acest fenomen — în cursul *respiraţiei* — corespunde procesului de *fosforilare oxidativă* al cărui mecanism intim este puţin cunoscut. Este probabil că în cursul oxidării are loc fosforilarea unui catalizator care asigură transportul de electroni pentru ca, ulterior, acesta să transfere, la rîndul său, grupul fosfat pe ADP, cu formare de ATP. În felul acesta, catalizatorul este redus şi poate reacţiona din nou cu un alt grup fosfat.

În procesele metabolice de tipul *fermentaţiei*, în care diferiţi compuşi organici servesc în acelaşi timp ca donator şi ca acceptor de H în reacţiile de oxido-reducere producătoare de energie, mecanismul obişnuit de formare a ATP este cunoscut sub denumirea de *fosforilare la nivelul substratului*. În cursul acestui proces are loc adiţia prin acţiunea enzimatică a P la o substanţă în curs de oxidare, cu producerea unei legături ~ în produsul oxidat. În etapa următoare, grupul P este transferat la ADP cu formare de ATP.

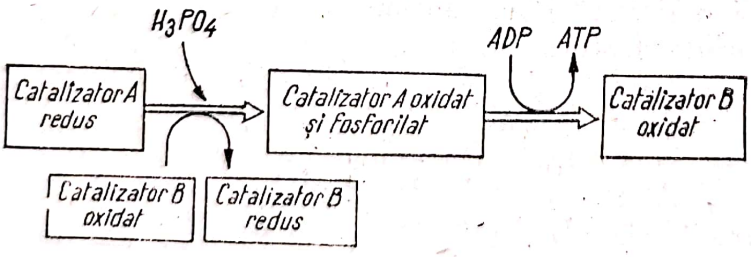


Fig. 156. Reprezentare schematică a procesului de fosforilare oxidativă (fosforilare la nivelul catalizatorului).

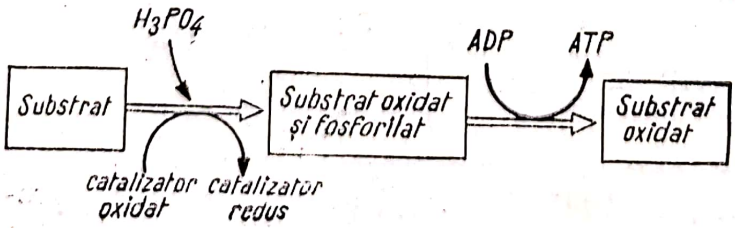


Fig. 157. Reprezentare schematică a procesului de fosforilare la nivelul substratului.

Scanned with OKEN Scanner

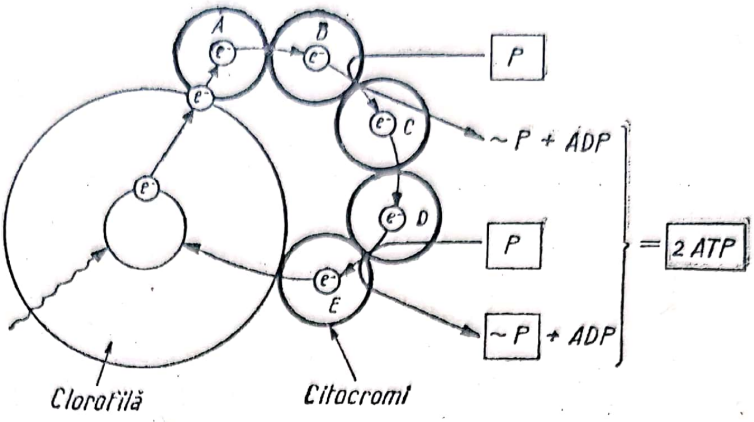


Fig. 158. Reprezentare schematică a procesului de fosforilare fotosintetică. Un electron dintr-un atom al moleculei de clorofilă „excitată" de un foton furnizează energia necesară pentru formarea de ATP. Electronul smuls de pe orbita sa și capturat de un prim transportor de electroni (*A*), trece succesiv de-a lungul unei serii de acceptori de electroni (*B*, *C*, *D*, *E*), cedînd progresiv energie. Parte din această energie este utilizată pentru formarea de ATP. Ciclul se încheie prin reintrarea electronului în molecula de clorofilă.

În sfîrșit, unele bacterii pot produce ATP pe seama ADP prin intervenția acetil-CoA, moleculă bogat energetică a cărei energie poate fi folosită pentru producerea de ATP pe seama P și a ADP, după reacția globală:

$$\underbrace{CH_3—CO\sim CoA}_{\text{Acetil CoA}} + ADP + PO_4H_3 \rightarrow CH_3—COOH + CoA + ATP$$

În cazul microorganismelor fotosintetizante, care prin procesul de fosforilare fotosintetică transformă energia radiantă luminoasă în energie chimică de legătură, producerea de ATP se realizează prin intervenția unui mecanism particular corespunzînd procesului așa-numit de *fotofosforilare ciclică.*

Tipurile de respirație la microorganisme. În funcție de comportarea lor față de oxigenul molecular, microorganismele pot fi grupate în patru tipuri respiratorii:

1) *Microorganismele strict — sau obligatoriu — aerobe* (*B. subtilis, B. anthracis, Ps. aeruginosa, Myc. tuberculosis* etc.) care folosesc O_2 ca acceptor final de H în ultima etapă a transferului de electroni în sistemul citocromilor; ca urmare, ele au nevoie de prezența continuă a oxigenului atmosferic. Incapacitatea lor de a trăi în anaerobioză s-ar datora lipsei enzimelor respiratorii necesare respirației anaerobe sau faptului că, pentru ele, produșii finali ai respirației anaerobe sînt toxici.

2) *Microorganismele strict — obligatoriu — anaerobe* (*Cl. tetani, Cl. botulinum, Welchia perfringens* etc.) nu se pot dezvolta în prezența oxigenului molecular și, ca urmare, se pot cultiva numai în medii sărăcite în oxigen. Ele sînt lipsite de enzimele respiratorii din categoria citocromilor și, implicit, de citocromoxidază. În această deficiență rezidă și explicația anaerobiozei lor stricte, deoarece în prezența O_2, care se comportă ca acceptor final de H, se formează de astă dată nu apă, ci peroxid de hidrogen, conform reacției: $S—H_2 + O_2 \rightarrow S + H_2O_2$.

După M c L e o d, microorganismele aerobe — spre deosebire de cele anaerobe — nu sînt expuse acțiunii toxice a apei oxigenate, deoarece ele sau nu produc acest peroxid, sau, dacă-l produce, au două posibilități de a-l descompune rapid: fie prin intrarea în acțiune a *catalazei,* enzimă care-l folosește ca sub-

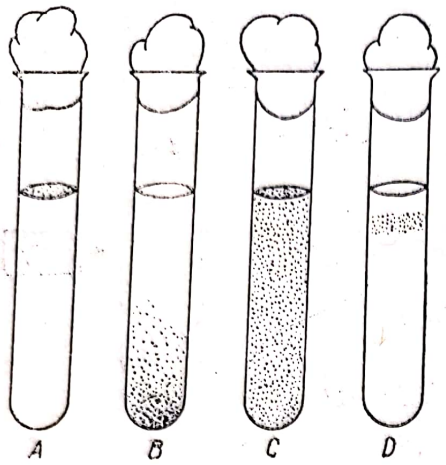


Fig. 159. Tipurile de respiraţie la bacterii:

A — bacterie strict aerobă *(Pseudomonas fluorescens)*; *B* — bacterie strict anaerobă *(Clostridium botulinum)*; *C* — bacterie aerobă, facultativ anaerobă *(E. coli)*; *D* — bacterie microaerofilă *(Brucella abortus)*.

strat, prezentă la aproape toate bacteriile aerobe ($2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2\,H_2O + O_2$), fie prin utilizarea lui ca acceptor de electroni (H) în oxidările catalizate de peroxidaze care îl reduc la apă ($H_2O_2 + 2(H) \rightarrow 2\,H_2O$). Bacteriile anaerobe sînt însă lipsite şi de catalază şi ca atare sînt susceptibile de a suferi de pe urma acţiunii H_2O_2 care se acumulează în mediu în concentraţii toxice. După o altă ipoteză, moartea anaerobilor obligaţi în prezenţa oxigenului nu s-ar datora acţiunii directe a acestui element, sau a unui produs al metabolizării lui, ci ar fi determinată de creşterea potenţialului de oxidoreducere care ar afecta ireversibil activitatea proteinelor lor enzimatice, foarte sensibile la oxidare. O dovadă în sprijinul acestei ipoteze o constituie faptul că anaerobii obligaţi pot fi totuşi cultivaţi în prezenţa O_2, dacă în mediu se adaugă substanţe reducătoare ca cisteina, acidul ascorbic etc., care menţin potenţialul de oxido-reducere la un nivel scăzut.

3) *Microorganismele aerobe facultativ anaerobe* (*E. coli, Staphylococcus sp., Streptococcus* etc.), capabile să-şi orienteze metabolismul (spre respiraţie sau spre fermentaţie) în funcţie de disponibilităţile de O_2, au în mod obişnuit un metabolism de tip anaerob, fără însă a fi sensibile la prezenţa O_2. Unele dintre microorganismele de acest tip respirator, şi anume levurile, pot trece de la metabolismul aerob la cel anaerob în funcţie de condiţiile de mediu.

4) *Microorganismele microaerofile* (*Spirochaetales, Thiobacteriales* etc.) au nevoie de o cantitate de O_2 mai mică decît aceea din aerul atmosferic. Această particularitate s-ar datora sensibilităţii unora dintre enzimele lor la condiţiile de oxidare puternică.

2. PROCESELE DE ASIMILARE LA BACTERII

Asimilarea — proces prin care materialul nutritiv de natură exogenă sau produşii simpli derivaţi din el sînt încorporaţi în substanţa proprie a unui organism — se realizează prin intermediul căilor anabolice ale metabolismului. Căile anabolice sînt secvenţe de reacţii enzimatice, desfăşurate în trepte, prin care se efectuează sinteza constituenţilor celulari pornind de la percursori reprezentaţi de produşi intermediari ai catabolismului sau de substanţe preluate din mediu.

Procesul de asimilare constă deci fie din preluarea ca atare a metaboliţilor intermediari sau a unor substanţe furnizate de mediu, fie din metabolizarea lor mai departe ca subunităţi de construcţie utilizate în reacţiile de biosinteză a con-

Scanned with OKEN Scanner

stituenţilor celulari. Asemenea reacţii implică, în linii mari, mai întîi activarea precursorilor sub acţiunea ATP şi apoi aranjarea lor într-o ordine riguroasă — cel puţin în cazul proteinelor, acizilor nucleici şi al unor polizaharide — după o secvenţă specifică, proprie fiecărui constituent celular, sub acţiunea enzimelor de biosinteză corespunzătoare. Asimilarea, care din punct de vedere biochimic reprezintă elaborarea prin biosinteză a unui compus asemănător cu o substanţă celulară dată, se realizează deci prin asamblarea unui număr mic de blocuri de construcţie (20 de aminoacizi, 5 baze nucleice etc.) — comune tuturor fiinţelor vii — în macromolecule cu caracter specific (proteine, acizi nucleic etc.) caracteristice pentru fiecare specie, asamblare rezultînd din organizarea unor secvenţe specifice complexe. Acest proces de sinteză a macromoleculelor specifice este posibil datorită prezenţei şi activităţii în celulă a materialului genetic — purtătorul informaţiei ereditare — care joacă rolul de model sau tipar (template) în biosinteză.

Procesele de asimilare evoluează în mod diferit, în funcţie de prezenţa sau absenţa O_2 în mediu. În cazul asimilării oxidative, efectuată în prezenţa O_2 şi, ca atare, caracteristică microorganismelor aerobe, numai o parte din substratul consumat este folosit pentru oxidări, restul (circa 50%) fiind asimilat şi convertit în constituenţi specifici celulari, ceea ce are ca rezultat o creştere celulară intensă însoţită de multiplicarea activă. Dacă însă mediul conţine numai cantităţi limitante de substanţe folosite ca sursă de C şi energie, consumul de O_2 continuă pînă cînd tot substratul din mediu este epuizat, după care procesele metabolice se desfăşoară mai departe la un nivel scăzut — caracteristic celulelor în repaus — sursa de energie fiind în acest caz endogenă. Spre deosebire de asimilarea oxidativă, în cursul proceselor anaerobe de fermentaţie substanţele carbonate şi energetice din mediu sînt folosite pentru formarea de constituenţi celulari numai în proporţie de 5% — chiar în cazul celulelor în curs de creştere — în timp ce restul este degradat în vederea obţinerii de energie, substanţele rezultate din reacţiile de degradare acumulîndu-se în mediu ca produşi finali ai fermentaţiei.

3. PRINCIPALELE TIPURI DE NUTRIŢIE BACTERIANĂ

Bacteriile pot folosi pentru activitatea lor vitală fie energia radiantă luminoasă, în care caz — avînd capacitatea de *fotosinteză* — au un mod de nutriţie **fototrof**, fie energia liberată prin reacţii chimice oxidative, la întuneric, aşa cum se întîmplă cu marea majoritate a bacteriilor care sînt capabile numai de *chimiosinteză* şi aparţin, ca atare, tipului de nutriţie **chimiotrof**.

Microorganismele fototrofe, relativ puţin importante numeric, pot fi, la rîndul lor, sau *fotolitotrofe*, dacă folosesc ca donatori de H — adică de electroni — diferite substraturi anorganice oxidabile, sau *fotoorganotrofe*, atunci cînd creşterea lor este dependentă de prezenţa unor substraturi organice cu funcţie de donatori de electroni.

În mod similar, chimiotrofele, care-şi obţin energia din reacţii de oxido-reducere, se împart şi ele, după natura substraturilor folosite ca donatori de electroni, în *chimiolitotrofe* şi *chimioorganotrofe*.

Scanned with OKEN Scanner

În sfîrşit, o categorie aparte din punctul de vedere al originii energiei folosite o constituie organismele paratrofe, care se dezvoltă utilizînd energia furnizată de celula-gazdă pe care ele o parazitează.

În raport cu capacitatea ei de biosinteză a metaboliţilor esenţiali, celula bacteriană îşi poate desfăşura activitatea vitală printr-una din următoarele modalităţi de nutriţie:

1) *Autotrofia*, care corespunde capacităţii de sinteză a tuturor constituenţilor celulari pornind de la surse anorganice simple de C şi de N, ca: CO_2, NH_3, NO_2^-, NO_3^- etc.

2) *Heterotrofia*, care implică incapacitatea de sinteză a unor metaboliţi esenţiali şi, decurgînd din aceasta, nevoia obţinerii lor din mediu ca substanţe preformate. Organismele cu asemenea insuficienţă metabolică nu se pot dezvolta decît în prezenţa unor substanţe organice care servesc cel puţin ca sursă de energie, de C şi de N, astfel încît în timp ce autotrofele sintetizează substanţa organică pornind de la compuşi minerali simpli, heterotrofele nu-şi pot realiza sinteza substanţei proprii decît dacă dispun de substanţe organice pe care să le descompună pînă la produşi mai mult sau mai puţin simpli utilizabili în metabolismul lor.

3) *Hipotrofia*, care impune condiţionarea capacităţii de multiplicare celulară de o reorganizare adecvată a unor structuri şi activităţi complexe ale celulei-gazdă.

a. Bacteriile fotosintetizante (fototrofe)

Procesele de fotosinteză se realizează prin două tipuri de reacţii care evoluează cuplat:

1) *Reacţii fotochimice*, în care energia luminoasă absorbită de pigmenţii fotosintetizanţi este transformată în energie de legătură chimică prin formare de ATP în urma unui proces de fotofosforilare.

2) *Reacţii de biosinteză*, în care energia chimică de legătură este folosită pentru sinteza de material celular pornind fie de la CO_2, în cazul organismelor fotolitotrofe ($CO_2 + 2\,H_2 \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O) + H_2O$), fie de la alimente organice, în cazul organismelor fotoorganotrofe.

În funcţie de nivelul de oxidare relativă al substratului organic şi al materialului sitetizat, ultimul tip de fotosinteză poate fi însoţit de consum sau de formare de CO_2 după reacţia: *substrat organic* $\pm$ $CO_2 \xrightarrow{\text{lumină}}$ *material celular*.

Dintre cele două categorii de reacţii amintite, cele de conversiune a energiei luminoase în energie chimică (formarea de ATP prin fotofosforilare) sînt caracteristice pentru fotosinteză, în timp ce reacţiile de biosinteză sînt comune şi altor categorii de organisme nefotosintetizante.

După natura donatorului de H folosit pentru reducerea CO_2 la substanţe susceptibile de a intra în alcătuirea materialului celular, bacteriile fototrofe pot fi împărţite în fotolitotrofe şi fotoorganotrofe.

B a c t e r i i l e f o t o l i t o t r o f e (fotoautotrofe) trăiesc în medii complet anorganice, utilizînd S redus (în general H_2S) ca donator de H. Ele sînt

reprezentate prin două grupuri mai importante, şi anume *grupul sulfobacteriilor roşii (purpurii)* din familia *Thiorhodaceae* (genurile *Chromatium, Thiosarcina, Thiocapsa, Thiocystis, Lamprocystis* etc.) şi *grupul sulfobacteriilor verzi* din familia *Chlorobacteriaceae* (genurile *Chlorobium, Chlorobacterium, Chlorochromatium*), care trăiesc în medii bogate în S şi H_2S. Aceste bacterii, strict anaerobe, folosesc H_2S ca donator exogen de electroni pentru sinteza materialului lor celular, pornind de la CO_2. Reacţia are loc în două stadii succesive, cu formare de S elementar ca produs intermediar:

1) $2\,H_2S + CO_2 \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O) + H_2O + 2\,S$;

2) ${}_3CO_2\ 2\,S + 5\,H_2O \xrightarrow{\text{lumină}} {}_3(CH_2O) + 2\,SO_4^{--} + 4\,H^+$.

Cînd mediul este bogat în H_2S, în celula bacteriană are loc numai prima reacţie, iar S rezultat din ea se acumulează fie în celulă — sub formă de granule refringente — la bacteriile din grupul sulfobacteriilor purpurii, fie în mediu la bacteriile mai mici, aparţinînd grupului sulfobacteriilor verzi. În momentul în care H_2S din mediu s-a epuizat, în celula bacteriană se produce cea de-a doua reacţie prin care se consumă S acumulat intracelular sau este reabsorbit cel extracelular.

Bacteriile fotoorganotrofe (fotoheterotrofe) — bacterii purpurii nesulfuroase din familia *Athiorhodaceae* (genurile *Rhodospirillum, Rhodopseudomonas, Rhodomicrobium* — sînt microorganisme în general anaerobe (unele specii sînt aerobe) care se deosebesc de cele fotoautotrofe prin aceea că drept donatori de H folosesc nu compuşi anorganici ai S, ci substanţe organice sub forma a diferiţi acizi graşi simpli sau alcooli ca, de exemplu: izopropanolul, după reacţia

$$\underset{\text{izopropanol}}{2\,CH_3{-}CHOH{-}CH_3} + CO_2 \xrightarrow{\text{lumină}} \underset{\text{acetonă}}{2\,CH_3{-}CO{-}CH_3} + (CH_2O) + H_2O.$$

Unele specii, ca şi thiorhodaceaele, pot utiliza facultativ chiar H ca agent reducător ($2\,H_2 + CO_2 \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O) + H_2O$), iar altele se pot dezvolta chiar în absenţa luminii, obţinîndu-şi energia pe seama oxidării unor substanţe organice reduse.

Aparatul fotosintetic al bacteriilor. Pigmenţii fotosintetizanţi ai bacteriilor sînt localizaţi, ca la toate celulele procariote, la nivelul unor structuri membranoase intracitoplasmatice numite *cromatofori*, analoge din punct de vedere funcţional cloroplastelor care formează aparatul fotosintetizant al celulelor eucariote. Spre deosebire însă de cloroplaşti, care sînt unităţi complete de funcţie fotosintetizantă, deoarece conţin şi enzimele biosintetizante ale ciclului ribuloz-difosfatului, cromatoforii sînt mai simpli şi nu conţin decît pigmenţii clorofilieni şi sistemul de transport al electronilor.

În celulele de *Rhodospirillum rubrum* cultivate la lumină, se găsesc circa 5—6 000 de cromatofori, fiecare conţinînd pînă la 200 de molecule de bacterioclorofilă.

Cromatoforii bacteriilor fototrofe conţin două tipuri de pigmenţi: *bacterioclorofile* şi *carotenoizi*. Bacteriile roşii au bacterioclorofilă asociată cu carotenoizi, în timp ce în celulele bacteriilor verzi predomină aşa-numitele *clorofile de Chlorobium*, iar carotenoizii aliciclici se găsesc numai în cantităţi

mici. Datorită acestor diferenţe de ordin chimic între pigmenţii lor asimilatori, cele două tipuri de bacterii fotosintetizante au spectre de absorbţie complet diferite şi, ca atare, ele utilizează în fotosinteză energie luminoasă cu lungimi de undă diferite. Clorofilele bacteriene absorb radiaţii a căror lungime de undă este apropiată de aceea a radiaţiilor infraroşii şi, în consecinţă, bacteriile pot face fotosinteză în condiţii de luminozitate foarte scăzută, aproape de obscuritate, corespunzînd unei zone a spectrului neperceptibilă de ochiul omenesc. În felul acesta, bacteriile pot trăi în ape la adîncimi mai mari, unde primesc radiaţiile care au trecut prin filtrul biologic reprezentat de algele situate la suprafaţă.

Capacitatea bacteriilor de a utiliza radiaţiile infraroşii asigură obţinerea unui supliment din energia solară pe suprafaţa globului. După cum au arătat Stanier şi Cohen-Bazire, din suprapunerea spectrelor de absorbţie ale diferitelor organisme fotosintetizante rezultă că practic toate regiunile spectrului de lumină solară sînt folosite în fotosinteză. Această particularitate are drept consecinţă, printre altele, o relaţie de complementaritate între fotosinteza bacteriană şi aceea a algelor în mediul acvatic: algele fac fotosinteză în aero-

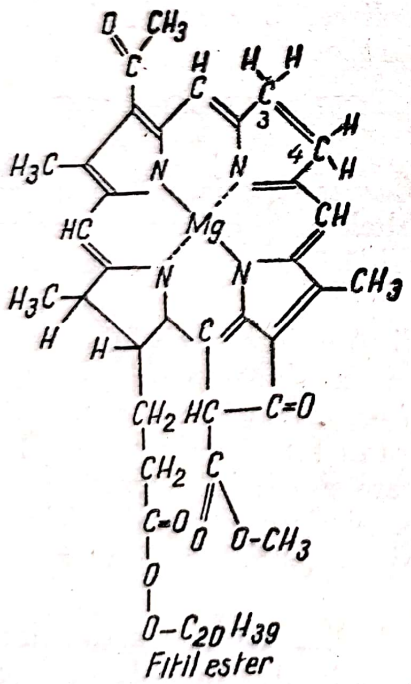


Fig. 160. Structura chimică a bacterioclorofilei *a*.

Fig. 161. Secţiune longitudinală prin bacteria *Chlorobium thiosulfatophilum*:

w — peretele celular cu prelungiri; *m* — membrana citoplasmatică; *M* — mezozomii; *cv* — veziculele de clorobium delimitate de o membrană (*vm*) opacă la electroni (microelectronografie după Cohen-Bazire).

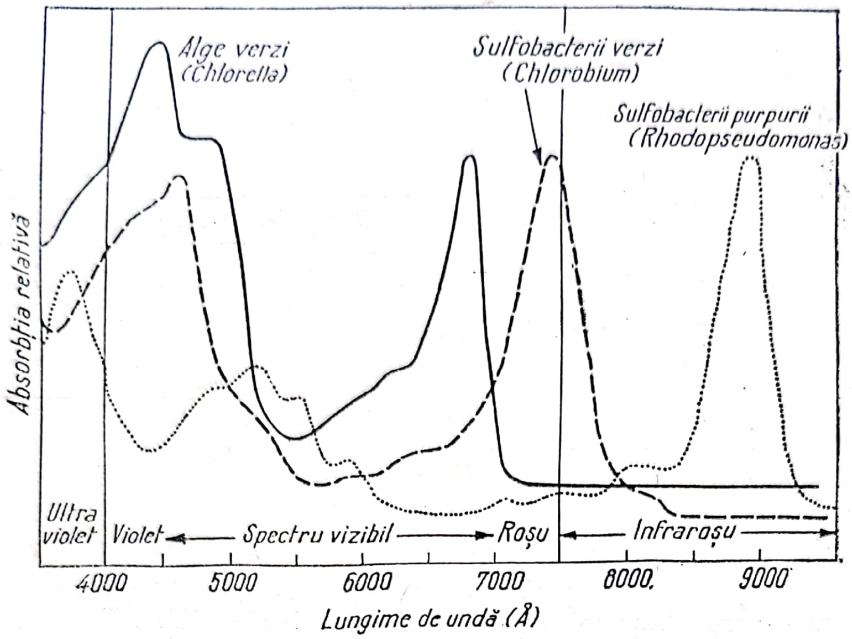


Fig. 162. Spectrele de absorbție a luminii de către o algă verde *(Chlorella)*, o sulfobacterie purpurie *(Rhodopseudomonas)* și o sulfobacterie verde *(Chlorobium)*. În regiunile roșii și infraroșii benzile de absorbție ale celor trei microorganisme sînt complementare (după Stanier).

bioză la suprafața apelor, absorbind radiațiile din regiunile albastre și roșii și lăsîndu-le să treacă în profunzime pe cele din regiunile roșu îndepărtat și infraroșu, care sînt preluate de bacteriile fototrofe în procesele lor de fotosinteză anaerobă din zonele mai adînci ale apei și de la suprafața mîlului.

Biochimia comparată a reacțiilor de fotosinteză. Fotosinteza plantelor verzi implică două reacții fotochimice cuplate — una ciclică și alta neciclică — furnizînd împreună ATP și puterea reducătoare necesară pentru transformarea CO_2 în glucide pe calea ribuloz-difosfaților:

Reacția fotochimică: $2\,NADP + 2\,H_2O + 2\,ADP + 2\,P \rightarrow 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2 + 2\,ATP$; $ADP + P \rightarrow ATP$.

Reacția de biosinteză: $CO_2 + 2\,NADPH + 2\,H^+ + 3\,ATP \rightarrow (CH_2O) + H_2O + 2\,NADP + 3\,ADP + 3\,P$.

Suma acestor reacții este echivalentă cu ecuația globală clasică a fotosintezei plantelor: $CO_2 + 2\,H_2O \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O) + H_2O + O_2$.

Spre deosebire de plantele verzi, bacteriile fotosintetizante nu produc oxigen molecular în timpul fotosintezei, deoarece ele nu folosesc niciodată apa ca ultim donator de electroni. Creșterea lor este condiționată de prezența în anaerobioză a unor donatori exogeni de electroni, diferiți de H_2O, care pot fi compuși reduși ai sulfului (H_2S), substanțe organice (de exemplu, izopropanol) sau chiar H molecular. În ciuda acestor diferențe, natura fundamentală a fotosintezei la plantele verzi și la bacteriile fototrofe este, după Van Niel, esențial aceeași. Numitorul comun al oricărui proces de fotosinteză

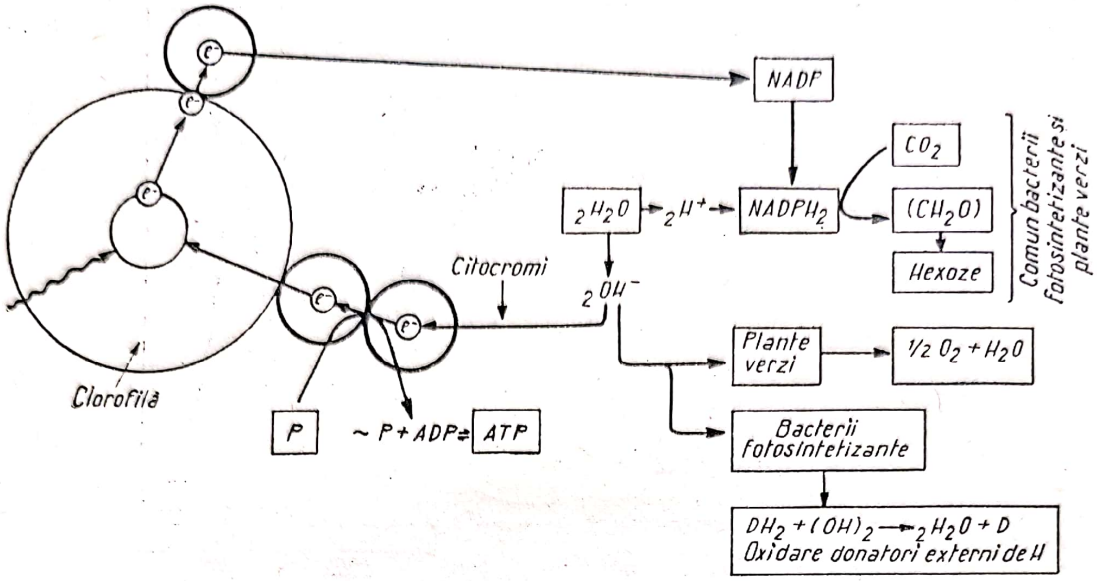


Fig. 163. Reprezentare schematică a procesului de fotosinteză. Chlorofila activată pierde electroni care, împreună cu ionii H^+ rezultați din fotoliza apei, reduc NADP. Ionii OH^- restituie clorofilei electronii prin intermediul unor transportori de electroni. În acest timp are loc și sinteza ATP prin fosforilare fotosintetică. Desenul evidențiază similitudinea proceselor de fotosinteză la bacterii și la plantele verzi, după ipoteza lui Van Niel, scoțînd în evidență și deosebirile dintre ele.

este procesul de fotoliză a apei: sub acțiunea energiei luminoase captate de pigmentul asimilator, H_2O se descompune într-un component reducător (H) și altul oxidant (OH). Cel dintîi (H), este folosit — în toate tipurile de foto-

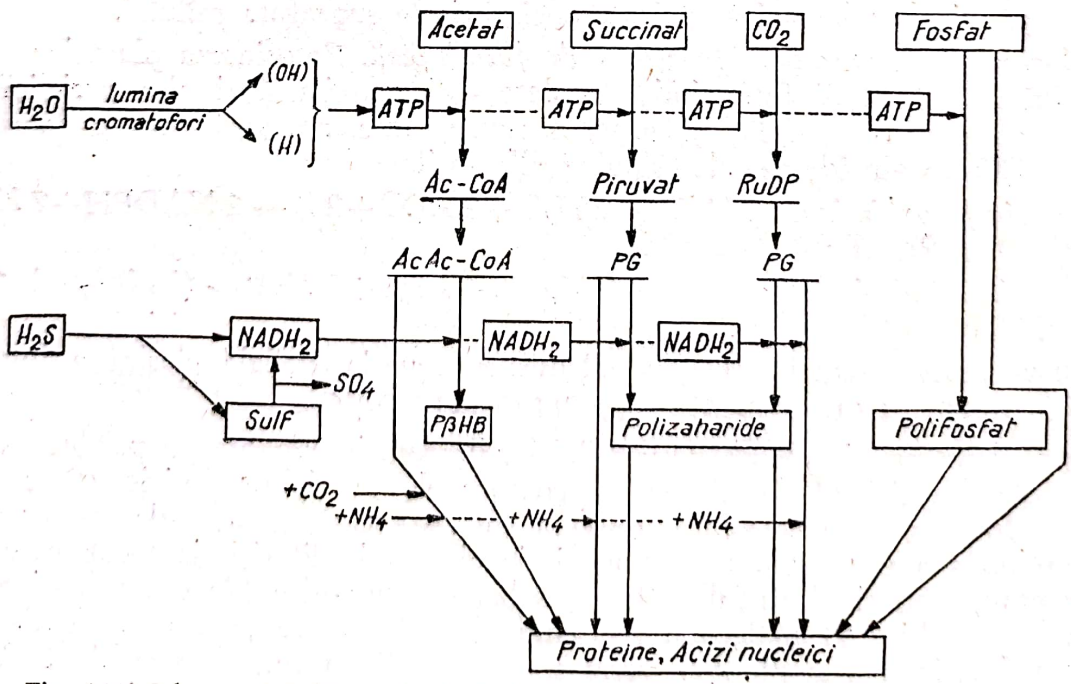


Fig. 164. Schema globală a asimilării fotosintetice la bacterii (după Schlegel).

sinteză — pentru reducerea CO_2 şi formarea de material celular, reacţii independente de lumină care au loc la întuneric. Cel de-al doilea produs de fotoliză a apei (OH) este transformat de plantele verzi în O_2 şi H_2O, iar la celelalte organisme fotosintetizante este folosit pentru oxidarea unui alt substrat redus (H_2A). Fenomenul poate fi reprezentat sintetic prin reacţiile:

(1) $4\,H_2O + 4\,h\nu \longrightarrow 4\,[H] + 4\,[OH]$
(2) $4\,[H] + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O$
} reacţie la lumină, comună la toate fototrofele (bacterii şi plante verzi)

(3) $4\,[OH] \xrightarrow{h\nu} 2\,H_2O + O_2$ la plantele verzi
(3 a) $4\,[OH] + 2\,H_2A \longrightarrow 4\,H_2O + 2\,A$ la bacteriile fototrofe
} reacţii la întuneric

în care: $h\nu$ reprezintă energia dintr-o cuantă de lumină; [H] şi [OH] — produşii reduşi şi respectiv oxidaţi derivaţi din fotoliza apei; (CH_2O) — produsul ultim al biosintezei; H_2A — donator de H sau agent reducător, care poate fi H_2S sau alt compus reducător organic sau anorganic.

Reacţia globală: $4\,H_2O + CO_2 + 2\,H_2A \xrightarrow{\text{lumină}} (CH_2O) + 5\,H_2O + 2\,A$.

b. Bacteriile chimiosintetizante (chimiotrofe)

Bacteriile chimiolitotrofe (chimioautotrofe). Această categorie de microorganisme include grupe de bacterii autotrofe care-şi obţin energia necesară sintezelor şi altor manifestări vitale din reacţii de oxido-reducere folosind diferite substraturi oxidabile anorganice ca donatori de electroni. Unele dintre ele sînt numai facultativ autotrofe, avînd posibilitatea de a folosi substanţe organice foarte simple.

Sulfobacteriile chimioautotrofe, larg răspîndite în natură în medii bogate în S sau H_2S ca izvoarele sulfuroase, nămolul şi mîlul, apele de canal, minele de sulf etc. îşi obţin energia din oxidarea S şi a compuşilor săi anorganici.

1) *Sulfobacteriile filamentoase* (*Beggiata, Thiothrix, Thioploca* etc.), considerate de unii autori (Stanier) ca alge albastre filamentoase, sînt microorganisme aerobe în ale căror celule se acumulează rezerve de S, atunci cînd dez-

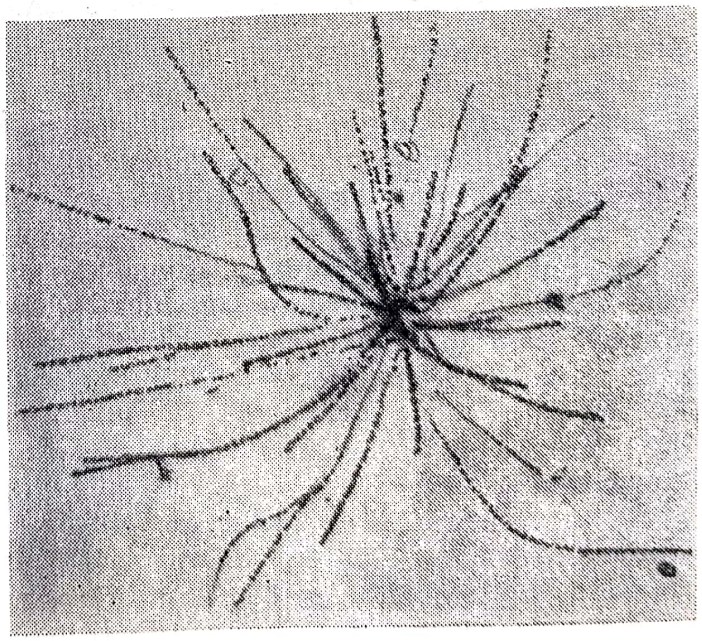


Fig. 165. *Beggiatoa* sp. Filamente bacteriene conţinînd picături de sulf.

voltarea are loc în prezenţa H_2S şi a O_2 (reacţia 1) şi care, dacă nu se pot aproviziona cu S din mediu, folosesc aceste rezerve celulare pînă la epuizarea lor, cînd celula moare (reacţia 2): (1) $2\,H_2S + O_2 \rightarrow 2\,S + 2\,H_2O$ + energie; (2) $2\,S + 2\,H_2O + O_2 \rightarrow 2\,H_2SO_4$ + energie 283,6 cal.

Cu ajutorul energiei liberate din reacţiile de oxidare a S aceste bacterii reduc CO_2 la compuşi care intră în alcătuirea materialului celular: $2\,H_2S + CO_2 \rightarrow 2\,S + H_2O + (CH_2O)$; $2\,S + 5\,H_2O + 3\,CO_2 \rightarrow 2\,H_2SO_4 + (CH_2O)$.

2) *Sulfobacteriile bacilare*, aparţinînd genului *Thiobacillus*, sînt în general litotrofe striote, care pot oxida mai multe forme reduse ale S (H_2S, S, thiosulfat) şi depun sulful oxidat în afara celulei:

a) *Thiobacillus thioparus*, aerob obligat, oxidează numai tiosulfaţii: $5\,Na_2S_2O_3 + H_2O + 4\,O_2 \rightarrow 5\,Na_2SO_4 + H_2SO_4$.

b) *Th. thiooxidans* oxidează S la H_2SO_4, care se poate acumula în mediu pînă la o concentraţie de 1,5 M, ceea ce coboară sub 0 *p*H-ul mediului

$S + 1^1/_2\,O_2 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$ + energie;

$CO_2 \xrightarrow{\text{energie}}$ constituenţi celulari.

c) *Th. ferrooxidans*, aerob obligat, oxidează sărurile feroase: $2\,FeSO_4 + H_2SO_4 + {}^1/_2\,O_2 \rightarrow Fe_2(SO_4)_3 + H_2O$ + energie.

d) *Th. denitrificans*, prezent în ape, în sol şi în nămol oxidează S şi compuşii săi numai în prezenţa nitraţilor ca agenţi oxidanţi, reducîndu-i concomitent pe aceştia din urmă la N molecular care se degajă în atmosferă:

(*1*) $6\,KNO_3 + 5\,S + 2\,H_2O \rightarrow K_2SO_4 + 4\,KHSO_4 + 3\,N_2$ + energie;

(*2*) $5\,Na_2S_2O_3 + 8\,KNO_3 + 2\,NaHCO_3 \rightarrow 6\,Na_2SO_4 + 4\,K_2SO_4 + 4\,N_2 + 2\,CO_2 + 2\,H_2O$ + energie.

Bacteriile din această specie joacă un rol negativ în natură, determinînd procesul de denitrificare prin care solul este sărăcit în nitraţi.

Ferobacteriile (*Gallionella* sp., *Crenothrix polyspora*) trăiesc în apele feruginoase care conţin în soluţie — sub formă de $Fe(HCO_3)_2$ — fierul provenit din compuşii dizolvaţi din roci de apele încărcate cu CO_2. Ele formează depozite de culoare ruginie datorite prezenţei hidroxidului feric coloidal produs prin activitatea lor metabolică şi care se depune ca un manşon pericelular în jurul filamentului bacterian. Reacţia producătoare de energie este: $2\,Fe(HCO_3)_2 + {}^1/_2\,O_2 + H_2O \rightarrow 2\,Fe(OH)_3 + 4\,CO_2$ + energie.

Bacteriile nitrificatoare sînt autotrofe obligate, răspîndite în ape şi în sol, care-şi obţin energia din oxidarea aerobă a compuşilor azotaţi. Ele determină procesul de nitrificare — etapă importantă în circulaţia azotului în natură — care se desfăşoară în două etape succesive în care sînt implicate microorganismele specifice:

1) *Nitritbacteriile* (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis* sp.) oxidează amoniacul la nitriţi: $2\,NH_3 + 3\,O_2 \rightarrow 2\,HNO_2 + 2\,H_2O$ + 79 kcal.

2) *Nitratbacteriile* (*Nitrobacter*, *Nitrocystis* sp. etc.) oxidează nitriţii la nitraţi, care sînt asimilaţi de plante în reacţiile de formare a N proteic: $HNO_2 + {}^1/_2\,O_2 \rightarrow HNO_3$ + 21,6 kcal.

Bacteriile care exidează hidrogenul molecular sînt autotrofe facultative, deoarece pot folosi şi compuşi organici, pentru care oxidarea H molecular (gazos) reprezintă unica sursă de energie.

Scanned with OKEN Scanner

Bacteriile din această categorie dispun de o enzimă — *hidrogenaza* — care catalizează reacţia $H_2 \rightleftharpoons 2H$ şi posedă sistemul enzimatic necesar pentru transformarea CO_2 în material celular.

Bacteriile metanigene (*Methanobacterium omelianskii, Methanococcus* sp., *Methanosarcina* sp.), prezente în straturile profunde de nămol din mlaştini şi din apele de canal, sînt anaerobe stricte care-şi iau energia din oxidarea anaerobă a unor compuşi minerali sau organici simpli (alcooli). Ele folosesc CO_2 ca principal acceptor final de H, formînd cantităţi mari de CH_4 care se pot ridica la suprafaţa apelor sub formă de bule. Reacţia prin care se produce formarea metanului este: $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$. Aceste bacterii sînt prezente şi în rumenul rumegătoarelor, unde participă la degradarea anaerobă a ţesuturilor vegetale.

Bacteriile care oxidează oxidul de carbon (*Carboxydomonas oligocarbophyla*) sînt autotrofe facultative prezente în sol, capabile să utilizeze CO, oxidîndu-l la CO_2.

Bacteriile care oxidează metanul, deşi nu sînt chimiolitotrofe, metanul fiind cel mai simplu compus organic, sînt descrise împreună cu organismele litotrofe deoarece metabolismul lor este similar cu al acestora. *Methanomonas methanica*, anaerob strict prezent în nămolul de canal, foloseşte metanul ca unică sursă de C şi energie după reacţia: $CH_4 + 2O_2 \rightarrow CO_2 + 2H_2O$ + energie.

Bacteriile fixatoare de azot, heterotrofe sub raportul sursei lor de C şi energie, sînt încă mai puţin exigente în ceea ce priveşte sursa de N decît autotrofele, care folosesc compuşi azotaţi mai complecşi ca NH_3, nitriţi, nitraţi, deoarece ele pot utiliza chiar N molecular. Răspîndite în apă şi în sol, aceste microorganisme sînt reprezentate de specii libere aerobe (*Azotobacter* sp.) sau anaerobe (*Clostridium pasteurianum*) şi specii „fixate", care trăiesc în simbioză cu plantele leguminoase (bacteriile de nodozităţi din genul *Rhizobium*).

B a c t e r i i l e c h i m i o o r g a n o t r o f e (c h i m i o h e t e r o t r o f e). Bacteriile care şi-au pierdut capacitatea de a-şi sintetiza toţi metaboliţii esenţiali reprezintă un grup de microorganisme cu metabolism de tip chimiosintetizant, heterogen sub raportul exigenţelor nutritive ale diferitelor specii. Unele heterotrofe saprofite sau condiţionat patogene (*Escherichia coli, Pseudomonas sp.*) au nevoie de o sursă organică de C şi energie (glucoză, alcooli, acizi organici) dar îşi păstrează capacitatea de a folosi N anorganic (NH_3, nitriţi, nitraţi). Alte heterotrofe, cele fito- sau zoopatogene şi chiar unele saprofite şi-au pierdut şi capacitatea de a folosi N anorganic, astfel încît au nevoie, în mod variabil de la o specie la alta, de anumiţi aminoacizi fără de care nu se pot dezvolta. Astfel, *Salmonella typhi* are nevoie de un singur aminoacid (*triptofan*), în timp ce bacteria saprofită *Leuconostoc mesenteroides* are nevoie să găsească în mediu 17 aminoacizi. În sfîrşit, pentru unele bacterii patogene sînt indispensabile chiar unele substanţe organice complexe, cum sînt cele prezente în sînge (*Bordetella pertussis, Haemophilus* sp.) sau în serul sanguin şi lichidul de ascită (bacterii din genul *Neisseria* ca gonococul şi meningococul). La limita extremă a heterotrofiei se găsesc bacteriile parazite intracelular, care sînt obligate să folosească diferitele substanţe complexe din celulele vii pe care le parazitează.

Scanned with OKEN Scanner

4. FACTORII DE CREŞTERE

Unele microorganisme au nevoie nu numai de surse de energie, de C şi de N, ci şi de anumite substanţe organice oligodinamice, esenţiale pentru metabolismul lor, numite *factori de creştere*. Acţiunea acestora fiind asemănătoare aceleia exercitate de vitamine în metabolismul animalelor superioare, ele au mai fost numite, prin analogie şi *vitamine microbiene*. Factorii de creştere ai unui anumit microorganism sînt acele substanţe pe care microorganismul dat este incapabil să le sintetizeze în cursul metabolismului său şi în absenţa cărora multiplicarea lui este imposibilă (L w o f f). Ei nu sînt numai substanţe indispensabile vieţii unor anumite organisme, care nu se pot dezvolta în lipsa lor, ci reprezintă metaboliţi esenţiali care sînt necesari tuturor microorganismelor. La unele microorganisme însă, factorii de creştere sînt de origine endogenă, fiind elaboraţi prin biosinteză în cursul metabolismului celular, astfel încît prezenţa lor în mediu ca substanţe preformate nu este necesară şi, ca atare, exigenţele bacteriene în această privinţă nu sînt evidente. În schimb, microorganismele care nu au capacitatea de a sintetiza unul sau mai mulţi dintre aceşti metaboliţi esenţiali nu pot trăi decît dacă mediul lor este suplimentat cu factorul sau factorii de creştere pentru a căror sinteză facultăţile lor metabolice sînt deficitare. Astfel, *aneurina* (*vitamina* B_1 sau *thiamina*) este esenţială pentru *Staphylococcus aureus*, în al cărui mediu de creştere trebuie adăugată, dar ea poate fi sintetizată de *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* şi *Thiobacillus thiooxidans*, specii care, tocmai de aceea se pot dezvolta chiar în absenţa ei din mediu. *Biotina* este absolut necesară în mediu pentru *Rhizobium* sp. şi *Saccharomyces cerevisiae*, acidul folic pentru *Lactobacillus casei* şi *Streptococcus lactis*, iar *acidul pantotenic* pentru *Streptococcus pyogenes* şi *Corynebacterium diphteriae* ş.a.m.d. Diversitatea acestor deficienţe metabolice la bacterii explică marea varietate a exigenţelor lor în ceea ce priveşte prezenţa în mediu a anumitor vitamine microbiene. Acţiunea factorilor de creştere se exercită în concentraţii extrem de mici: de exemplu, 10^{-4} M în cazul aminoacizilor şi 10^{-6}—10^{-10} M în cazul vitaminelor grupului B.

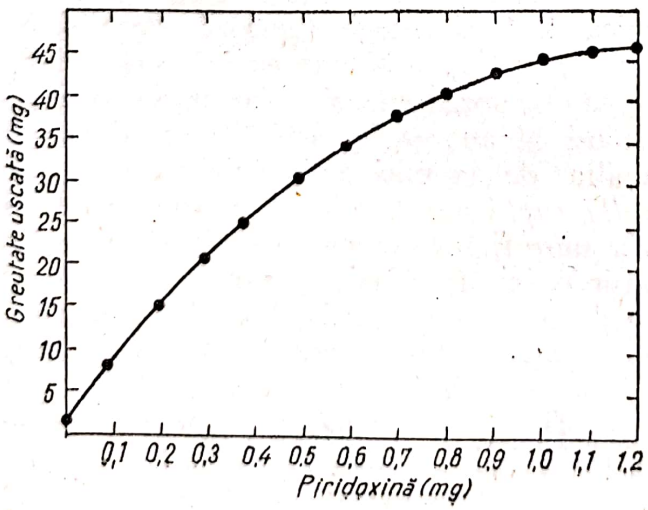


Fig. 166. Influenţa cantităţii de piridoxină din mediu asupra multiplicării unei tulpini mutante de *Neurospora* care are nevoie de acest factor de creştere.

Scanned with OKEN Scanner

În ceea ce privește modul lor de acțiune, cei mai mulți factori de creștere sînt coenzime sau părți constitutive de coenzime: acidul nicotinic → nicotinadenindinucleotizii (NAD și NADP); riboflavina → dehidrazele flavinice (FAD); tiamina → cocarboxilaza; adicul pantotenic → coenzima A; biotina → enzime cu biotină, ș.a.m.d. În sfîrșit, unii factori de creștere ca aminoacizii, purinele, pirimidinele pot fi încorporați ca atare sau cu mici modificări în structura constituenților celulari, iar alții reprezintă trepte intermediare esențiale în metabolismul unor celule bacteriene.

Factorii stimulatori de creștere sînt substanțe care, fără a fi esențiale pentru supraviețuirea și multiplicarea unor microorganisme, le accelerează sau ameliorează dezvoltarea atunci cînd sînt adăugate în mediu (de exemplu, biotina pentru *S. cerevisiae*). Efectul stimulator al îmbogățirii mediului de cultură cu acești factori se datorește faptului că deși microorganismele îi sintetizează, biosinteza lor se face într-un ritm prea lent și în cantități care nu pot satisface integral exigențele unei dezvoltări abundente a culturii. După L w o f f, nevoia de factori de creștere reflectă procesul de evoluție regresivă a unor microorganisme care au suferit o degradare fiziologică legată de scăderea potențialului celular de biosinteză. Această degradare poate fi *calitativă*, reprezentînd pierderea totală a unei funcții, ca urmare a instalării unei incapacități de sinteză, în care caz ea se manifestă prin exigența absolută față de un anumit factor de creștere fără de care viața celulei nu mai este posibilă. Ea poate fi și *cantitativă*, constînd numai din diminuarea unei activități funcționale, consecutive scăderii unei facultăți de sinteză, ceea ce se traduce prin necesitatea suplimentării hranei cu factorul stimulator corespunzător, atunci cînd se urmărește o dezvoltare optimă a populației celulare. Nevoia de factori de creștere a unor microorganisme este atît de specifică, încît multiplicarea lor este proporțională cu cantitatea de vitamină din mediu. Asemenea microorganisme sînt folosite în practică pentru aprecierea cantității de vitamină dintr-un mediu, apreciere a cărei sensibilitate a permis elaborarea unor metode de dozare microbiologică a vitaminelor.

5. METABOLISMUL GLUCIDIC LA MICROORGANISME

Metabolismul glucidelor la microorganisme este complex și se realizează prin căi de catabolism și sinteză care uneori variază în funcție de specie, astfel încît el nu poate fi prezentat într-o schemă unitară. Cea mai mare parte a rezervei de C din natură se găsește sub formă de oligo- și mai ales de polizaharide, care sînt degradate, într-o primă etapă, la constituenții lor monozaharidici.

Căile metabolismului glucozei la microorganisme. La cele mai multe microorganisme, catabolismul glucozei urmează căi similare acelora utilizate în organismul animalelor superioare. Calea catabolică cea mai frecvent folosită este aceea a hexozodifosfaților — calea Embden-Meyerhof-Parnas — al cărei produs final esențial este acidul piruvic, după reacția globală: $C_6H_{12}O_6 + 2\,NAD + 2\,ADP + 2\,Pi \rightarrow 2\,CH_3COCOOH + 2\,NADH + 2\,ATP$.

Scanned with OKEN Scanner

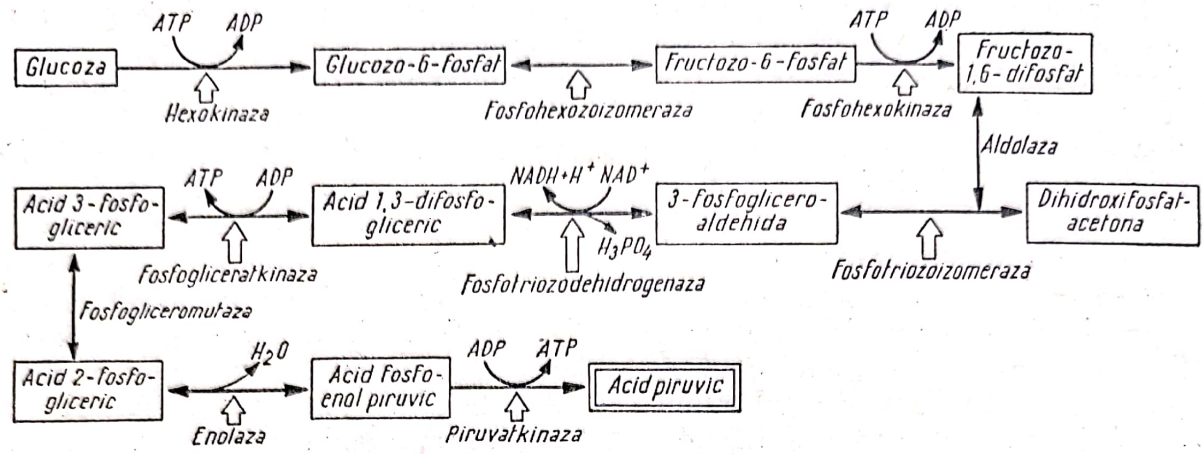


Fig. 167. Reprezentare schematică a catabolismului glucozei la bacterii după calea Embden-Meyerhof.

Microorganismele pot însă utiliza şi căi alternative. Astfel, la aproape toate bacteriile glucoza poate fi catabolizată şi pe calea pentozofosfaţilor sau a „Shuntului" hexozomonofosfaţilor, iar la unele grupuri, ca *Pseudomonas*, *Aeromonas* etc. pe calea Entner-Doudoroff (calea 2 oxo-3 dezoxi-6 fosfogluconat).

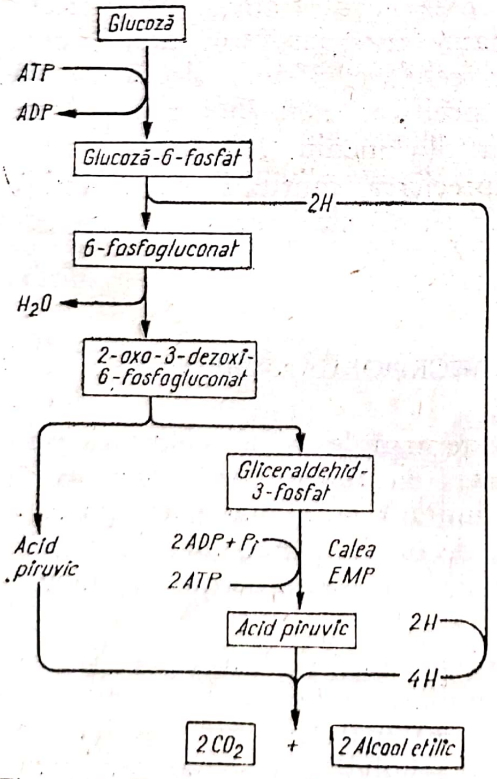


Fig. 168. Fermentaţia alcoolică a glucozei după calea Entner-Doudoroff de către bacteria *Pseudomonas lindneri*.

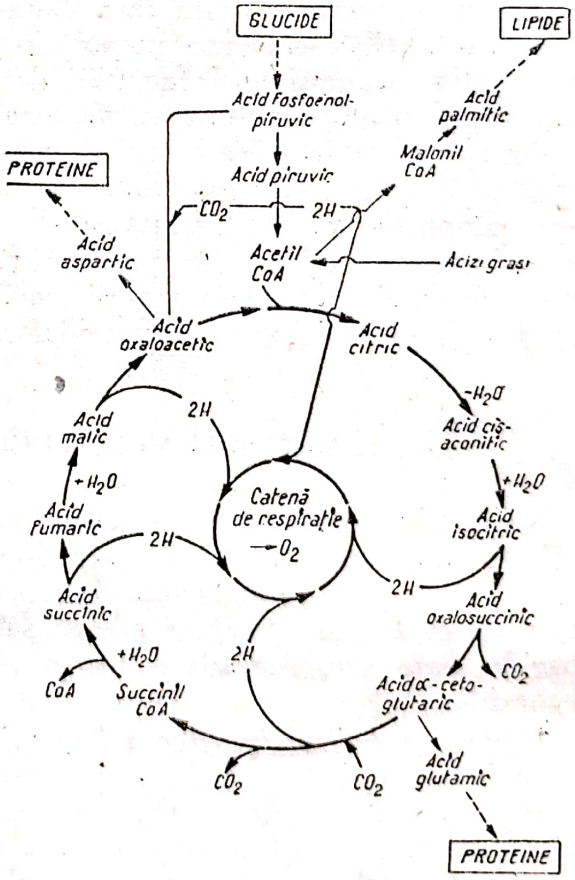


Fig. 169. Ciclul acizilor tricarboxilici (ciclul lui Krebs) la bacterii.

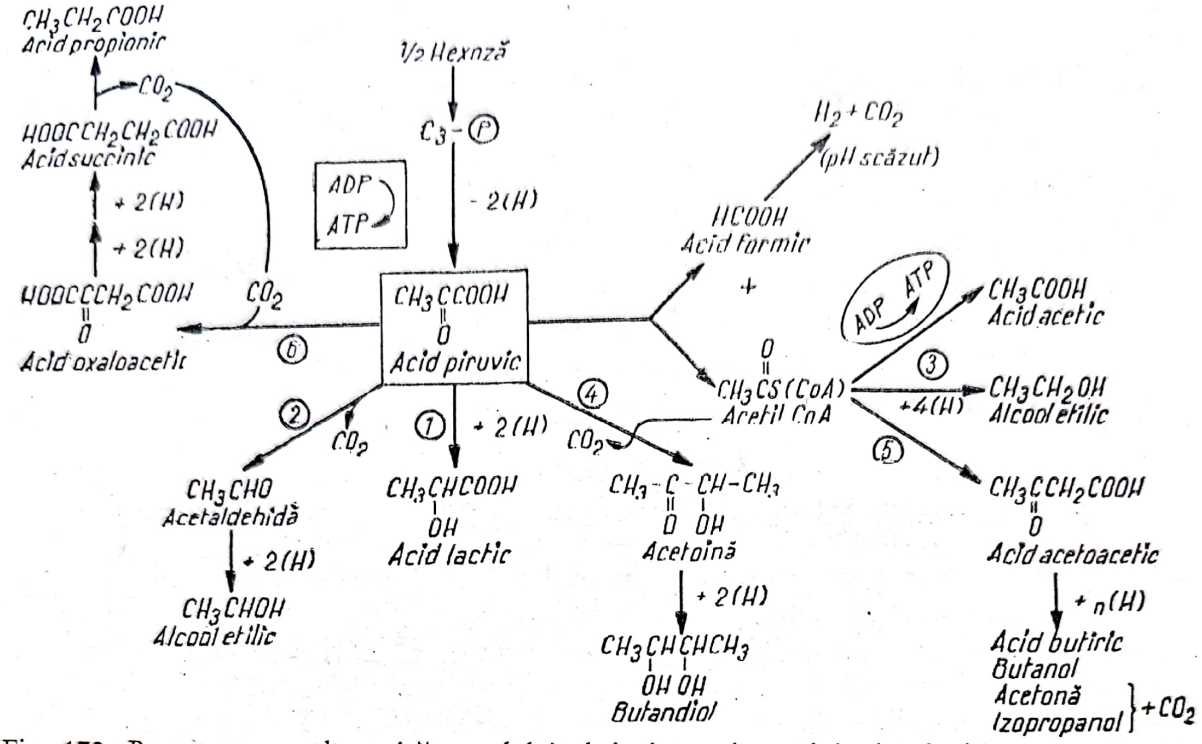


Fig. 170. Reprezentare schematică a rolului cheie jucat de acidul piruvic în principalele fermentaţii: fermentaţia lactică (*Streptococcus, Lactobacillus* sp.); fermentaţia alcoolică (levuri); fermentaţia acidă mixtă (*Enterobacteriaceae*); fermentaţia butandiolică (*Aerobacter*); fermentaţia butirică (*Propionibacterium* sp.) (după Davis).

Acidul piruvic — produs final al acestor căi de degradare — reprezintă o substanţă „cheie" a metabolismului, care este folosită în continuare pe mai multe căi, dintre care unele sînt specific microbiene. Calea principală de metabolizare a piruvatului este calea oxidativă cunoscută sub denumirea de *ciclul acidului citric* sau *ciclul lui Krebs*. La microorganismele aerobe, includerea piruvatului în ciclul lui Krebs are două consecinţe funcţionale importante: determină eliberarea unei mari cantităţi de energie şi furnizează precursori pentru o serie de aminoacizi (lizina, serina, izoleucina, metionina, alanina, valina, leucina etc.). O altă modalitate de descompunere a piruvatului o constituie decarboxilarea lui neoxidativă, care duce la formarea de acetaldehidă pornind de la care, în aerobioză, procesul evoluează în sensul aşa-numitei „fermentaţii" acetice specifice bacteriilor din genul *Acetobacter*, iar în anaerobioză în sensul fermentaţiei alcoolice specifice levurilor din genul *Saccharomyces* şi unor bacterii. În sfîrşit, o ultimă cale de utilizare a piruvatului — specifică bacteriilor din genul *Lactobacillus* — corespunde metabolizării acidului piruvic la acid lactic în procesul de fermentaţie lactică.

6. METABOLISMUL LIPIDELOR LA BACTERII

Deşi bacteriile au capacitatea de a sintetiza activ şi de a degrada acizii graşi, fosfolipidele şi sterolii, modul prin care se realizează aceste transformări este relativ puţin cunoscut.

Scanned with OKEN Scanner

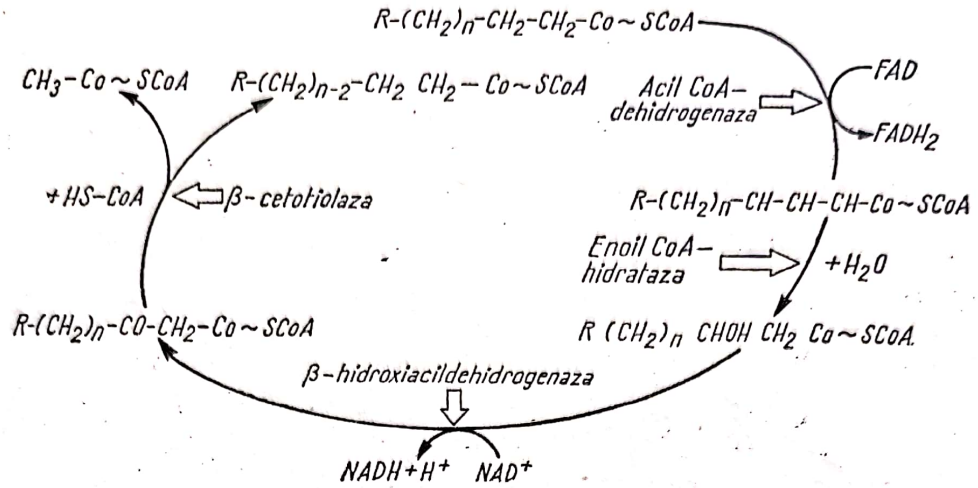


Fig. 171. Reacţiile biochimice de degradare a acizilor graşi la bacterii (ciclul lui Lynen). Reacţiile de sinteză pot fi considerate în sens invers, cu excepţia unor trepte particulare la nivelul restului acetil-*CoA*.

Degradarea şi sinteza acizilor graşi — proces al căror mecanism nu este încă elucidat la bacterii — urmează probabil în mare şi la aceste microorganisme căile metabolice clasice, de-a lungul ciclului lui Lynen stabilit la celulele animale. În acest metabolism, un rol important revine, şi la bacterii, acetil-coenzimei A (acetil-CoA) care joacă rolul unui intermediar cheie.

Iniţial, grăsimile sînt atacate de lipaze — în general extracelulare — care le scindează în acizi graşi şi glicerol, compus preluat în circuitul de degradare a glucidelor. Acizii graşi rezultaţi variază după natura grăsimilor de origine dar, în general, este vorba de acizi saturaţi cu 14—18 atomi de C (în special acizii palmitic şi stearic).

După cum reiese din schemă (fig. 171), într-o primă fază CoA activează acidul gras, formînd un compus macroergic (cu legătura puternic energetică ~). Compusul activat se degradează apoi, de-a lungul unor reacţii intermediare ale ciclului, pînă la un acid gras cu 2 atomi de carbon mai puţin şi un fragment dicarbonic cu CoA (acetil-CoA). Ciclul continuă pînă cînd — prin acelaşi mecanism de formare a unor acizi graşi cu 2 carboni mai puţin şi a unui fragment dicarbonic — întreg lanţul acidului gras supus degradării este transformat în fragmente de acetil-CoA. În sens invers, reacţiile duc la sinteza compuşilor complecşi (acizi graşi cu lanţ carbonic lung). Ele comportă participarea aceluiaşi transportor catalitic — coenzima A — şi a acizilor organici activaţi sub forma derivatelor lor acetil-CoA. Energia necesară este furnizată de ATP cu liberare de pirofosfat, după reacţia globală: acid organic + CoA + + ATP → Acetil-CoA + AMP + P~P.

7. METABOLISMUL PROTEINELOR LA BACTERII

În general, moleculele de proteină din mediul de cultură nu pot pătrunde în interiorul celulei bacteriene şi de aceea ele sînt în prealabil hidrolizate în molecule mai mici, sub acţiunea enzimelor proteolitice. Aceste enzime sînt de

Scanned with OKEN Scanner

două feluri: *1)proteinaze*, care scindează macromoleculele proteice în peptide şi *2)peptidaze* (în special intracelulare), care hidrolizează peptidele la aminoacizi. În celula bacteriană aminoacizii se găsesc cel mai frecvent în constituţia proteinelor şi mai puţin în stare liberă sau legaţi în molecule peptidice. Capacitatea de degradare a aminoacizilor este foarte răspîndită la bacterii, în special la cele Gram-negative, care pot ataca toţi aminoacizii întîlniţi în natură, în timp ce la Gram-pozitive capacitatea de metabolizare a amoniacizilor este mult mai limitată. În general, între capacitatea de a degrada aminoacizii şi aceea de a-i sintetiza există o corelaţie netă. Metabolismul bacterian al aminoacizilor nu poate fi prezentat într-o schemă generală, deoarece diversitatea structurii lor chimice face ca atît degradarea cît şi sinteza lor să se realizeze prin mai multe mecanisme diferite.

a. Degradarea aminoacizilor de către bacterii

La bacterii, metabolismul aminoacizilor decurge fie prin procese specifice de degradare, fie după două mecanisme fundamentale, comune şi altor organisme vii, şi anume: *1)* prin *dezaminare* şi *2)* prin *decarboxilare*.

Mecanismul dezaminărilor microbiene. Degradarea aminoacizilor prin reacţiile de dezaminare are ca rezultat formarea cetoacidului corespunzător şi eliberarea de NH_3 care poate fi ulterior folosit pentru sinteza altor substanţe azotate.

Mecanismul dezaminărilor microbiene nu este în întregime clarificat. Dezaminarea se poate produce în mai multe moduri, cu formarea unor produşi de reacţie diferiţi:

1) *Dezaminarea oxidativă*, care are ca rezultat formarea NH_3 şi a cetoacidului corespunzător, după reacţia generală:

$$R{-}CHNH_2COOH + {}^1/_2\,O_2 \rightarrow R{-}\overset{\overset{\displaystyle O}{||}}{C}{-}COOH + NH_3.$$

2) *Dezaminarea reductivă*, care duce la formarea unui caid gras saturat, după reacţia:

$$R{-}CHNH_2{-}COOH + H_2 \rightarrow R{-}CH_2COOH + NH_3.$$

3) *Dezaminarea desaturantă*, prin care se formează un acid gras nesaturat, după ecuaţia:

$$R{-}CH_2{-}CHNH_2{-}COOH \rightarrow RCH{=}CH{-}COOH + NH_3.$$

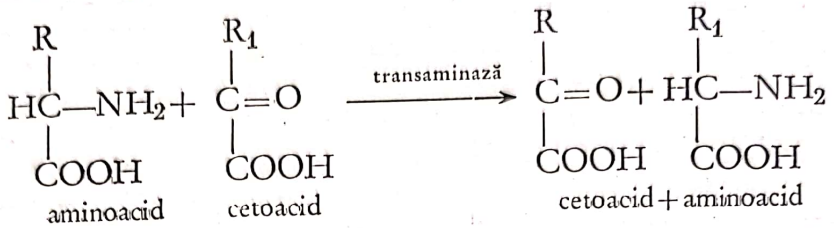
4) *Dezaminarea hidrolitică*, prin care se formează un hidroxiacid, după reacţia generală:

$$R{-}CHNH_2{-}COOH + H_2O \rightarrow R{-}CHOH{-}COOH + NH_3.$$

Transaminarea reprezintă o reacţie specială de dezaminare produsă sub acţiunea unor enzime specifice — *transaminazele* — prin care gruparea NH_2 a unui aminoacid este transferată în poziţia α a unui α-cetoacid, care în felul

Scanned with OKEN Scanner

acesta devine aminoacid, în timp ce primul aminoacid (cel care a pierdut NH_2) devine cetoacid, după reacţia generală:



Mecanismul decarboxilării aminoacizilor. Bacteriile decarboxilează anaerob aminoacizii cu scindarea grupării carboxilice (—COOH) şi formare de CO_2 şi amidă corespunzătoare, după ecuaţia generală:

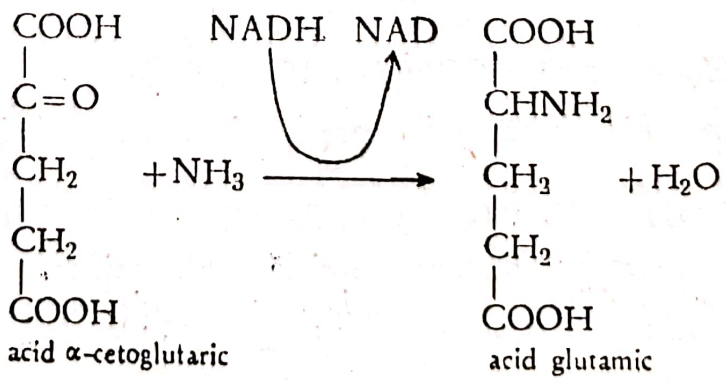
$$\underset{\text{aminoacid}}{R—CHNH_2—COOH} \rightarrow \underset{\text{amidă}}{R—CH_2—NH_2} + CO_2.$$

Reacţia este catalizată de enzime inductibile specifice, numite *decarboxilaze*, şi reprezintă unul dintre mecanismele importante prin care se formează CO_2 la microorganisme.

b. Biosinteza aminoacizilor

Capacitatea microorganismelor de a face biosinteza aminoacizilor constitutivi ai proteinelor, pornind de la metaboliţi intermediari, a fost demonstrată prin mai multe metode, între care un rol important revine tehnicilor bazate pe utilizarea atomilor marcaţi. Acest proces se realizează pe căi metabolice uneori foarte diferite şi independente, dintre care unele au un caracter general, fiind comune şi altor tipuri de celule, iar altele au un caracter specific, fiind proprii numai bacteriilor.

O primă cale metabolică generală este aceea care permite sinteza unor aminoacizi ca alanina, acidul glutamic şi acidul aspartic prin intermediul unei aminări directe pornind de la cetoacidul corespunzător, respectiv acidul piruvic, acidul α-cetoglutaric şi acidul oxaloacetic, deci printr-o reacţie inversă celei de dezaminare. Un exemplu este aminarea reducătoare a acidului α-cetoglutaric la acid glutamic, reacţia principală prin care NH_3 este transformat în N organic la organismele capabile să folosească acest compus drept sursă de N:



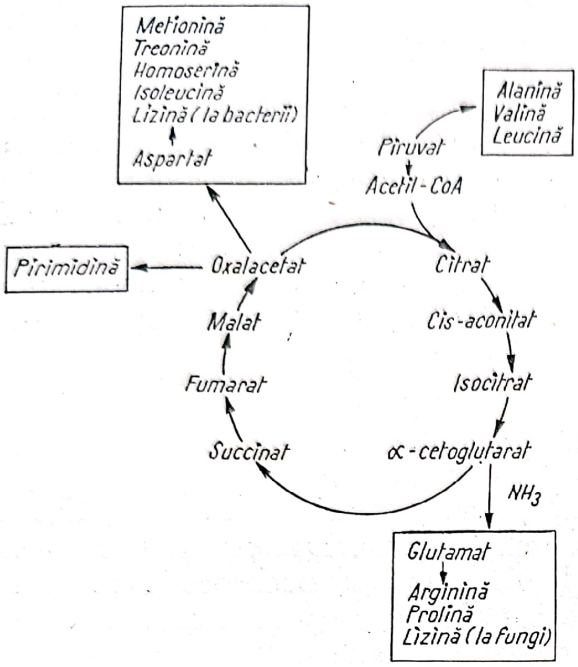
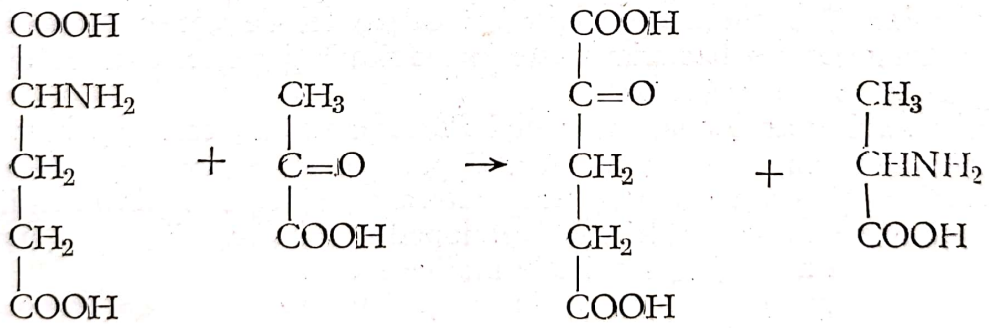


Fig. 172. Formarea aminoacizilor şi pirimidinelor în cursul metabolismului bacterian din produşii intermediari ai ciclului acidului citric. Fixarea primară a NH_3 are loc numai la formarea de acid glutamic pornind de la α-cetoglutarat. Toţi ceilalţi aminoacizi rezultă din reacţii de transaminare (după Kornberg).

O altă cale metabolică generală implică reacţiile de transaminare directă, foarte răspîndite în natură, care constau în transportul unui grup aminic de la un α-aminoacid la poziţia α a unui cetoacid pentru formarea unui nou aminoacid, după reacţia generală:

$$R_1—CHNH_2—COOH + R_2—CH_2 \cdot CO—COOH \rightarrow R_1—COCOOH + \\ + R_2—CH_2—CHNH_2—COOH.$$

Cea mai tipică reacţie de acest fel este aceea de formare a alaninei prin transaminarea de la acid glutamic la acid piruvic.



acid glutamic — acid piruvic — acid α-cetoglutaric — alanină

În mod similar, pornind de la acidul oxaloacetic se formează acid aspartic. Este probabil ca cea mai mare parte din NH_3 utilizat de celula bacteriană să fie încorporat pe calea acidului glutamic, pentru ca după aceea grupul NH_3 să fie transferat succesiv la alţi cetoacizi prin intermediul reacţiilor de transaminare. În afară de aceste căi generale de sinteză a aminoacizilor, mai există şi diferite căi specific bacteriene de biosinteză, care sînt însă mai puţin cunoscute.

Scanned with OKEN Scanner

c. Biosinteza proteinelor

Într-o primă fază, acest proces comportă *activarea aminoacizilor* individuali de către o enzimă specifică de activare, așa-numita *„enzimă de pH 5"* descrisă de Hoagland. După adiția la un aminoacid a porțiunii adenilice a moleculei de ATP, complexul activat (*aminoacil-AMP*) este transportat la ribozomi unde are loc procesul de *secvențializare* sau de *diataxie* al aminoacizilor. Acest proces de polimerizare se realizează prin aranjarea specifică a aminoacizilor în funcție de un model sau o matriță constînd dintr-un acid ribonucleic de tip special — ARN mesager — notat prescurtat ARN*m* [1].

8. LUMINESCENȚA BACTERIANĂ

Ipoteza că „fosforescența" peștilor morți sau a cărnii alterate s-ar datora unor viețuitoare a fost emisă de foarte multă vreme. De asemenea, s-a considerat mult timp că fenomenele de luminescență strălucitoare a mării în zonele populate cu un număr mare de dinoflagelate, meduze și alte organisme marine ar fi de natură bacteriană.

Bacteriile luminescente se împart în trei categorii: *1) parazite,* care produc infecții la insecte, amfipode și crustacei de apă dulce și sărată; *2) saprofite,* trăind pe substanțe organice în curs de descompunere; *3) simbiotice*, prezente în organele luminoase ale unor pești sau cefalopode. În acest din urmă caz, ele pot fi localizate în „saci" special compartimentați, analogi glandelor, ca la *Sepiola atlantica* sau în organite situate în peretele ventral al corpului, în maxilarul inferior, în peretele esofagului sau al intestinului, ca la unele specii de pești. Deși luminescența de origine bacteriană este continuă — spre deosebire de celelalte fenomene de bioluminescență — ea poate fi mascată intermitent la unele animale datorită unor structuri capabile să-i varieze intensitatea sau chiar să o anuleze, funcționînd ca un fel de „ecrane" mobile. În alte cazuri luminescența bacteriană este intensificată și concentrată cu ajutorul unor organe cu rol de „reflector".

Bacteriile luminescente aparțin genului *Photobacterium*, care cuprinde specii ca: *Ph. phosphoreum,* saprofit pe carne și pește mort, producător de luminescență numai în prezența O_2 și la temperatura de 15°C, *Ph. pierantonii,* simbiotic în organele fotogene ale unor cefalopode, *Ph. fischerii* și *Ph. harveyi,* izolate din apa de mare și din animale marine moarte.

În ce privește mecanismul ei, luminescența bacteriană este un fenomen de chemoluminescență, adică de emisiune de lumină determinată de anumite reacții chimice oxidative catalizate de o enzimă, *luciferaza.* În conformitate cu teoriile moderne, o moleculă capătă un exces de energie prin deplasarea unui electron de la un nivel mai mic, la un nivel mai ridicat de energie, în speță prin trecerea ei la așa-numită „stare excitată". În cazul bioluminescenței, substratul oxidabil este luciferina (o flavină modificată), acceptorul imediat de electroni este oxigenul liber, iar energia necesară pentru această deplasare a

[1] Biosinteza proteinelor este descrisă în detaliu la capitolul de genetică microbiană.

Scanned with OKEN Scanner

electronului este luată din reacţia chimică de oxidare. Cînd electronul respectiv se reîntoarce la nivelul său energetic de bază, el emite o cuantă de energie.

Cantitatea de energie luminoasă a unei suspensii (2 mg greutate uscată) de *Photobacterium phosphoreum* la 22°C este de 7,18 ergi/s (Eymers), iar lumina emisă de o singură celulă bacteriană are o intensitate de aproximativ 2×10^{-14} lumini pe „picior" (picior=unitate engleză de lungime, echivalentă cu 30,45 cm (Harvey).

Culoarea luminii depinde de cantitatea de energie liberată în cursul trecerii moleculei de luciferină de la starea sa excitată la cea originară.

Lumina produsă de bacteriile luminescente formează o bandă largă în regiunea albastră sau albastru-verde a spectrului (480—500 m μ).

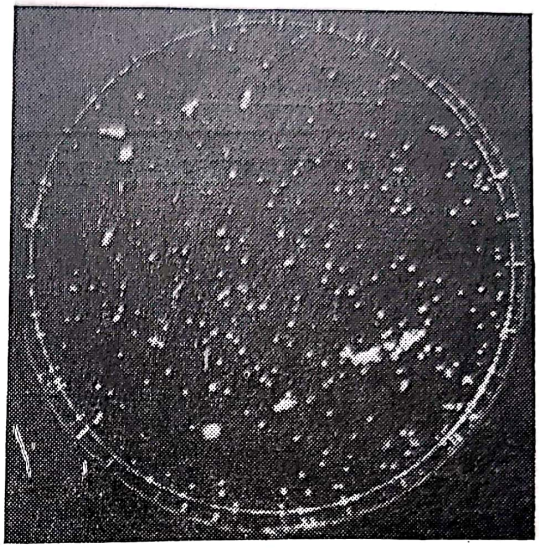


Fig. 173. Colonii luminescente ale bacteriei *Pseudomonas toyamensis* (fotografie făcută cu lumina emisă de bacterii) (după Harvey).

Coloniile de bacterii luminescente sînt atît de strălucitoare, încît pot determina la plante manifestări de fototropism pozitiv, după cum s-a demonstrat la mazăre şi măzăriche. Fenomenul în sine rămîne mai mult o curiozitate a naturii, deşi în ultimul război mondial s-a sugerat folosirea lui în timpul perioadelor de camuflaj.

Scanned with OKEN Scanner

CREŞTEREA ŞI MULTIPLICAREA BACTERIILOR

1. CREŞTEREA BACTERIILOR

Prin *creştere* — în sens biologic — se înţelege *mărirea coordonată a tuturor componenţilor unui organism uni- sau pluricelular, ca rezultat al adăugirii de substanţă nouă.* Acest proces este rezultatul sintezei specifice echilibrate, pornind de la substanţele nutritive din mediu, a unor compuşi noi care apoi sînt asamblaţi pentru a forma copii fidele ale constituenţilor celulari. Specificitatea lui este determinată de intervenţia unor mecanisme de control genetic. Pe de altă parte, procesul de creştere depinde în evoluţia sa de natura şi concentraţia substanţelor nutritive din mediu şi de aprovizionarea continuă a celulei cu energia necesară reacţiilor endotermice de sinteză. Creşterea microorganismelor — ca proprietate biologică esenţială — este condiţionată de trei factori: *1*) existenţa unor membrane de suprafaţă cu înalt grad de organizare care, prin permeabilitatea lor selectivă, menţin în celule o mare concentraţie o moleculelor necesare în procesele metabolice; *2*) prezenţa şi activitatea enzimelor care catalizează transformarea moleculelor-aliment în blocuri noi, de construcţie celulară; *3*) acţiune favorabilă a energiei solare, în cazul microorganismelor fotosintetizante, sau aceea a energiei liberate prin degradarea moleculelor-aliment, acţiune care se exercită mai degrabă asupra reacţiilor de biosinteză (de anabolism) decît asupra celor de descompunere (de catabolism).

Creşterea bacteriilor se realizează prin depunerea uni- sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia dintre dimensiunile ei sau în sensul tuturor celor trei dimensiuni — lungimea, lăţimea şi grosimea.

După L a m a n n a, dacă se face abstracţie de acţiunea forţelor externe care o pot deforma, celula bacteriană reflectă prin forma ei viteza relativă de creştere de-a lungul celor trei dimensiuni, unele celule avînd capacitatea de a creşte mai rapid în sensul axului lung decît în lăţime. Mărirea volumului celular se face la bacterii nu numai prin sinteza de substanţă organică, ci şi prin sporirea consecutivă accentuată a conţinutului lor de apă. Astfel, la *Proteus vulgaris,* unei creşteri în volum de cinci ori, îi corespunde o creştere în greutate uscată de numai două ori.

Creşterea bacteriilor nu se face la infinit, ci se întrerupe la un moment dat, cînd se produce diviziunea celulară. Iniţial s-a crezut că încetarea creşterii ar

Scanned with OKEN Scanner

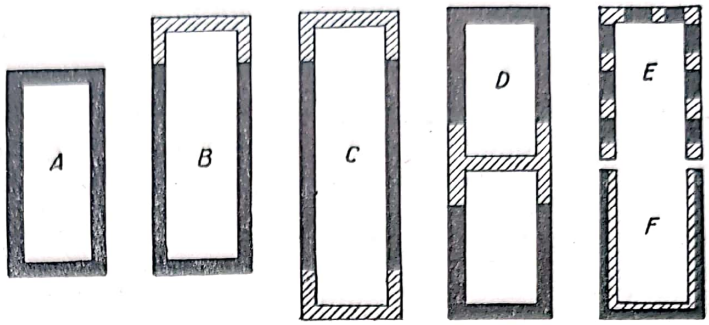


Fig. 174. Reprezentare schematică a diferitelor modalităţi de creştere a celulei bacteriene prin adăugarea de constituenţi noi (zona haşurată) la peretele celular normal (în negru):

A — perete celular în faza premergătoare creşterii; *B* — creştere limitată la una din extremităţi; *C* — creştere limitată la ambele extremităţi; *D* — creştere în vecinătatea septului transversal; *E* — creştere prin intussuscepţiune; *F* — creştere prin întinderea peretelui celular şi depunerea de material nou pe suprafaţa internă (după Lamanna).

fi datorită unor factori intrinseci, controlaţi genetic, iar diviziunea ar fi rezultatul unei modificări a raportului normal dintre masa citoplasmei şi aceea a substanţei nucleare. O altă ipoteză, aceea că încetarea creşterii ar fi determinată de epuizarea substanţelor nutritive din mediu sau de acumularea în el a unor cataboliţi toxici, a fost infirmată de observaţia că în aceeaşi cultură coexistă celule de vîrste diferite (tinere, adulte, pe cale de diviziune, bătrîne etc.).

Se admite astăzi mai curînd că activitatea normală a bacteriilor este condiţionată de existenţa unui anumit raport între volumul celulei, care consumă, şi suprafaţa ei, prin care se face absorbţia substanţelor nutritive şi eliminarea cataboliţilor. În cursul creşterii celulei bacteriene, raportul suprafaţă/volum se modifică datorită faptului că în timp ce suprafaţa bacteriilor creşte cu o raţie pătratică, volumul ei se măreşte cu o raţie cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeţei celulare. Aportul de material nutritiv din mediu devine astfel din ce în ce mai puţin adecvat exigenţelor metabolice. Pe de altă parte, pe măsură ce dimensiunile celulei se măresc, echilibrul ei chimic se alterează: concentraţia unor compuşi scade în timp ce alţii se acumulează, întrucît circulaţia substanţelor prin difuziune în ambele sensuri — spre interior şi spre exterior — devine mai dificilă. Datorită acestor fenomene, atunci cînd disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un anumit punct critic, raportul lor adecvat se restabileşte prin diviziunea celulei ajunsă la limita ei de creştere. În felul acesta, diviziunea celulară este prin ea însăşi o formă necesară de reglare automată a activităţii celulei bacteriene.

Studiul creşterii şi multiplicării bacteriilor are o importanţă teoretică de ordin general, deoarece, datorită faptului că celulele bacteriene cresc pe medii simple şi în mod independent, separat unele de altele, s-au putut descifra pe această cale probleme legate deopotrivă de creşterea celulelor individuale şi de cinetica dezvoltării populaţiilor. Aceste procese sînt greu de studiat la organismele superioare cum este omul, la care fiecare din cele circa 5×10^{12} celule care formează organismul se află în diferite grade de interdependenţă structurală şi funcţională cu celelalte.

Scanned with OKEN Scanner

2. MULTIPLICAREA BACTERIILOR

Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taliei individului, la bacterii, ca şi la toate celelalte organisme unicelulare, ea are ca rezultat creşterea numărului de indivizi. Acest proces se realizează pe două căi, dintre care una, *diviziunea simplă, directă* sau *binară*, este practic generală, iar cealaltă, *înmugurirea* sau *ramificarea*, este excepţională, fiind caracteristică numai unui număr relativ foarte mic de specii bacteriene.

Multiplicarea prin diviziune simplă. Tipică pentru majoritatea speciilor bacteriene atunci cînd celulele se află în condiţii optime de viaţă, diviziunea simplă constă în scindarea unui individ în două celule noi, care pot fi aproximativ egale (*diviziune izomorfă*) sau inegale (*diviziune heteromorfă*). La bacili şi spirili, diviziunea este de obicei transversală, urmînd un plan perpendicular pe axul mare al celulei şi numai excepţional, la unii spirili, ea se produce longitudinal, într-un plan paralel cu acest ax. Cocii se divid după 1, 2 sau 3 planuri perpendiculare succesive, ceea ce face posibilă gruparea celulelor-fiice în cîteva moduri caracteristice.

După Bisset, diviziunea bacteriilor s-ar putea face în două moduri: prin strangularea celulei şi prin formarea în interiorul ei a unui sept transversal.

Diviziunea prin strangulare, caracteristică bacteriilor în faza „S", se realizează prin îngustarea mediană a celulei, determinată de invaginarea membranei ei citoplasmice, urmată de creşterea spre interior, tot prin invaginare, a peretelui celular.

În felul acesta, fiecare dintre celulele-fiice are propriul său perete celular, astfel că în mod obişnuit ele se pot separa definitiv la sfîrşitul procesului. Cu toate acestea, în culturile tinere, la care diviziunea este foarte rapidă, se pot vedea bacili divizaţi prin septuri derivate din membrana citoplasmică în 3—4 celule-fiice, care însă nu sînt încă separate din cauza dezvoltării incomplete a pereţilor lor celulari.

Diviziunea prin sept transversal este caracteristică bacteriilor aflate în faza „R". La începutul procesului de diviziune, bacilul matur este deja traversat în regiunea sa mediană de un sept derivat din membrana citoplasmatică.

Acest sept este apoi scindat în lungul lui de un perete despărţitor care se formează pornind de pe faţa internă a peretelui celular, şi care creşte centripet, ca un diafragm. Cele două celule-fiice reunite sînt, la rîndul lor, divizate de un sept derivat din membrana citoplasmatică, astfel încît se formează un grup de patru celule dispuse în mod caracteristic şi ale căror septuri nou formate sînt de asemenea scindate ulterior de noi pereţi celulari transversali. La sfîrşitul diviziunii bacililor în fază R, separarea celulelor-fiice astfel rezultate

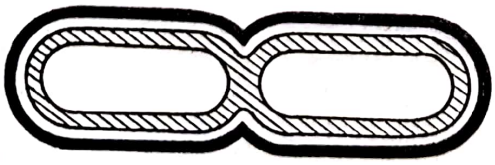


Fig. 175. Reprezentare schematică a diviziunii bacteriilor prin strangulare (după Scanga).

Scanned with OKEN Scanner

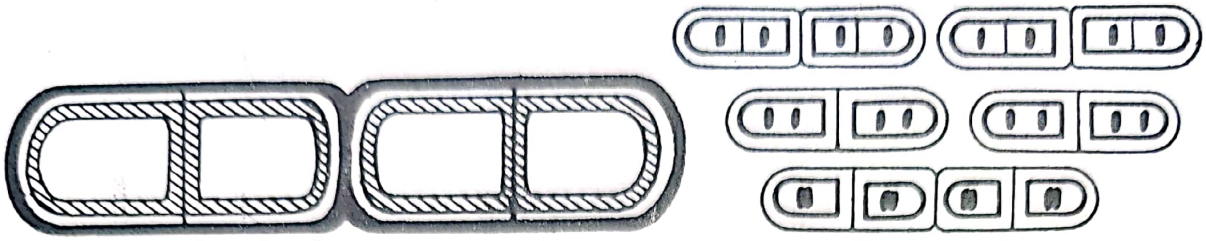


Fig. 176. Reprezentare schematică a diviziunii bacteriilor prin formarea unui sept transversal (după Scanga).

nu este obligatorie, iar atunci cînd se produce, ea este realizată tot prin scindarea peretelui transversal în două straturi separate de un perete celular nou format.

Diviziunea cocilor se face după mecanisme similare şi este precedată, ca la toate bacteriile, de alungirea celulei, care ia în acest caz o formă ovoidală, şi de diviziunea substanţei nucleare. După K n a y s i, multiplicarea bacteriilor se face după un mecanism unic în trei etape succesive: *1*) diviziunea citoplasmei prin intermediul unui sept transversal, derivat din membrana citoplasmatică şi dispus perpendicular sau oblic faţă de axul mare al celulei; *2*) gîtuirea la nivelul acestui sept a pereteui celular care formează, la rîndul său, un perete transvers, pătrunzînd prin creştere centripedă în interiorul septului citoplasmatic pe care-l separă în două straturi subţiri; celulele-fiice astfel rezultate au nucleu, citoplasmă şi membrane citoplasmatice proprii, dar peretele lor celular este comun; *3*) separarea efectivă a celulelor-fiice prin scindarea peretelui lor celular comun, urmată de despărţirea lor sub acţiunea forţelor de tracţiune din mediu şi în funcţie de elasticitatea peretelui celular; în unele cazuri, peretele celular transvers se formează incomplet, astfel că la sfîrşitul creşterii el nu mai apare ca un disc, ci are aspectul unui inel, iar septul membranos citoplasmatic transvers, rămas nescindat în regiunea sa centrală, alcătuieşte o plasmodesmă prin care cele două celule rămîn în continuare legate.

Multiplicarea prin ramificare şi înmugurire. La bacteria fotosintetizantă *Rhodomicrobium vannielli*, celula mică ovoidă — individul matur — formează o ramificaţie tubulară fină, ca o mică umflătură terminală, care, crescînd, devine o nouă celulă ovoidă, după care în mijlocul tubului de legătură se con-

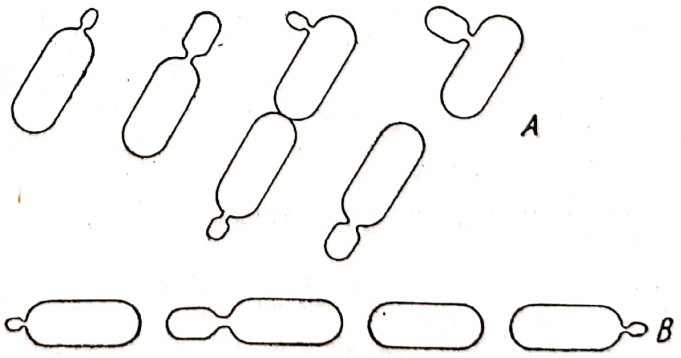


Fig. 177. Reproducerea bacteriilor prin înmugurire laterală şi terminală (*A* şi *B*).

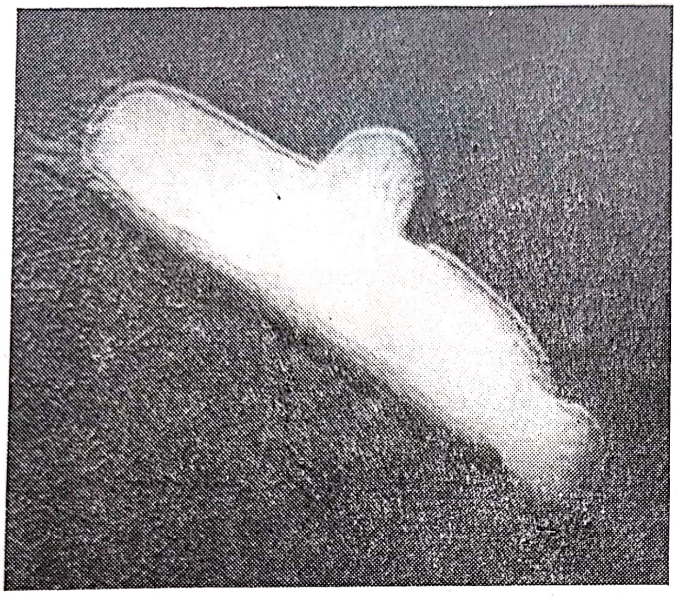


Fig. 178. Bacterie cilindrică în curs de înmugurire laterală şi terminală (după Scanga).

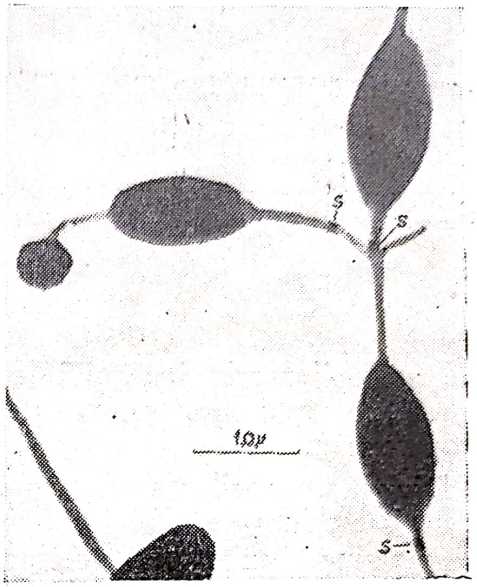


Fig. 179. *Rhodospirillum vannielli.* Se observă celule mature legate prin filamente şi o celulă-fiică pe cale să se desprindă. Unele filamente sînt întretăiate de septuri dense (*s*).

stituie un sept transversal. Celulele-fiice rezultate prin înmugurire au tendinţa să rămînă ataşate de cele din care au derivat, astfel că prin asemenea procese succesive de multiplicare se formează „colonii" de celule unite prin ramificaţiile lor tubulare. *Hyphomicrobium vulgare* se multiplică printr-un proces în esenţă similar. Celula ovalară de 0,5—0,75 μ × 0,6—5 μ emite prelungiri filamentoase (hife) cu diametrul de 0,2—0,3 μ, la extremităţile cărora apar prin înmugurire noi celule ovalare, iar una dintre aceste prelungiri — hifa principală — formează, la rîndul ei, ramificaţii care de asemenea înmuguresc pentru a forma celule noi. Celulele-fiice rămîn legate de celula-mamă sau de desprind de ea şi înoată liber în mediu.

Viteza de multiplicare a bacteriilor este excepţional de mare. Durata unei generaţii [1] — intervalul de timp dintre două diviziuni succesive — este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia, la aceeaşi specie în funcţie de condiţiile de mediu. În general, ea este de 20—30 de minute, limitele ei de variaţie în funcţie de specie fiind de 9 minute, la *B. megaterium*, şi 18 ore la *Mycobacterium tuberculosis.* Rapiditatea procesului de diviziune este o caracteristică a majorităţii bacteriilor, dar ea nu reprezintă un fenomen unic în biologie, aşa cum se credea iniţial, deoarece este specifică şi celulelor embrionare ale organismelor superioare. Dar, spre deosebire de celulele embrionare, celulele bacte-

[1] Numeroşi cercetători moderni apreciază capacitatea de creştere şi multiplicare a bacteriilor prin „timpul de generaţie" definit ca intervalul de timp necesar pentru dublarea masei celulare.

Scanned with OKEN Scanner

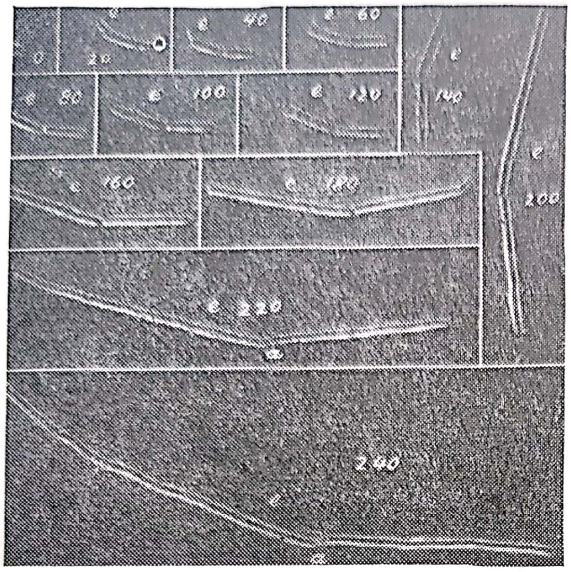
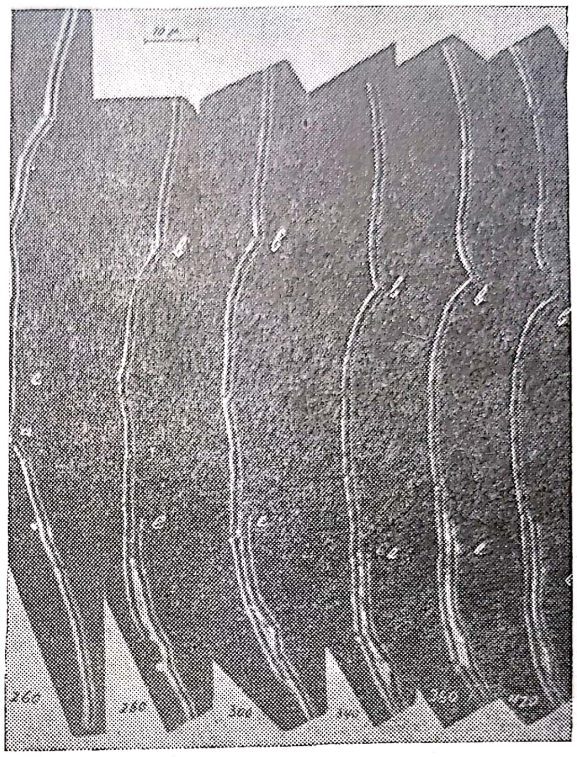


Fig. 180. Multiplicarea unui bacil pornind de la un spor. Cifrele indică minute de la începutul observației. După 260′, lanțul se rupe în punctul *a* și continuă să crească paralel cu cel inițial (după Knaysi).



riene fiice ajung la maturitate deplină într-un interval extrem de scurt. Rapiditatea multiplicării bacteriilor s-ar datora valorii foarte ridicate a raportului dintre suprafața și greutatea lor, valoare care, după Arnaudi, este de 400 000 ori mai mare decît în cazul omului. Celula bacteriană are, de aceea, o suprafață de absorbție proporțional foarte mare, grație căreia procesele ei de asimilare și sinteză, de creștere și reproducere se desfășoară într-un timp foarte scurt (tab. 9).

TABELUL 9

DURATA MEDIE A INTERVALULUI DINTRE DOUĂ DIVIZIUNI LA UNELE MICROORGANISME COMUNE ÎN CONDIȚII DE MEDIU OPTIME

Specia	Timpul în minute	Specia	Timpul în minute
Bacillus megaterium	9	*Treponema pallidum*	1 980
Escherichia coli	20	*Saccharomyces cerevisiae*	120
Proteus vulgaris	21	*Saccharomyces pombe*	240
Staphylococcus aureus	32	*Chlorella pyrenoidosa*	510
Diplococcus pneumoniae	34	*Anabaena cylindrica*	1 440
Mycobacterium tuberculosis	930—1 080	*Amoeba proteus*	1 440

Scanned with OKEN Scanner

3. EVOLUŢIA UNEI CULTURI BACTERIENE

În prezent se cunosc puţine date în legătură cu dinamica multiplicării populaţiilor bacteriene în natură. În condiţii experimentale, procesul este însă destul de bine cunoscut şi evoluează într-o serie de faze succesive:

1) *Faza de latenţă (de lag*[1]*) sau de „creştere zero"* este cuprinsă între momentul introducerii celulelor în mediu (însămînţare) şi momentul cînd ele încep să se multiplice. În cursul acestei faze, numărul bacteriilor din inoculum rămîne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această primă fază, care durează în medie două ore, se observă în modul cel mai evident atunci cînd bacteriile însămînţate provin din culturi vechi, deci sînt celule deficiente în enzime sau în produşi intermediari de metabolism. Multiplicarea unor asemenea bacterii nu devine rapidă decît în momentul în care aceste substanţe s-au acumulat prin sinteză în concentraţii optime. Dacă inoculul bacterian este prelevat dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare în aceleaşi condiţii de mediu ca şi cele oferite noii culturi iniţiate, multiplicarea bacteriilor îşi menţine în continuare ritmul rapid. În sfîrşit, dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponenţială, dar care creşteau pe un alt mediu decît cel în care sînt transferate prin însămînţare, creşterea lor pe noul mediu nu este evidentă decît după o perioadă de latenţă, necesară inducţiei unor enzime corespunzătoare noului substrat nutritiv. Faza de latenţă apare deci ca o perioadă de adaptare la condiţii noi de cultură, în care bacteriile viabile din inoculum îşi acumulează în celulă metaboliţii esenţiali şi sistemele enzimatce necesare creşterii, în cazul în care aceste componente biochimice le lipseau datorită condiţiilor de viaţă anterioare însămînţării.

2) *Faza de multiplicare exponenţială sau de creştere logaritmică* este caracterizată prin aceea că, după o scurtă perioadă (circa 2 ore) de accelerare a ritmului de creştere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresiv mărită, acest ritm devine constant şi caracteristic pentru un organism dat în anumite condiţii de cultură, durata unei generaţii fiind minimă. În această fază, celulele, considerate a fi de tip „embrionar", au dimensiuni mai mari decît cele caracteristice speciei, iar citoplasma lor este omogenă, nu conţine materiale de rezervă şi are o mare afinitate pentru coloranţii bazici datorită conţinutului ei ridicat în ARN. Celulele aflate în faza exponenţială de multiplicare sînt cele mai potrivite pentru cercetări de genetică şi fiziologie bacteriană.

În condiţii ideale de creştere şi multiplicare, cantitatea de materie vie creşte în funcţie de timp după o progresie geometrică, adică se multiplică printr-un factor constant la fiecare unitate de timp. Evoluţia unei culturi bacteriene ilustrează foarte bine progresia geometrică sau exponenţială a numărului de indivizi în funcţie de timp. Primele diviziuni după însămînţare sînt destul de bine sincronizate şi numărul celulelor viabile se dublează brusc şi la intervale regulate: populaţia bacteriană creşte temporar după o progresie geometrică cu raţia 2: $2^0, 2^1, 2^2, 2^3, \ldots, 2^n$. Deşi foarte caracteristică pentru bacterii, capacitatea de creştere exponenţială se manifestă ca atare numai o scurtă perioadă de timp,

[1] *to lag* (engl.) = a întîrzia, a rămîne în urmă.

Scanned with OKEN Scanner

atît în natură, cît și în condiții artificiale de laborator. După un timp relativ scurt, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor. Pe de altă parte, creșterea indivizilor din populația bacteriană nu se mai face sincron, datorită faptului că în aceste condiții de încetinire a ritmului de creștere devin manifeste unele mici diferențe individuale în ceea ce privește timpul de diviziune celulară. Chiar dacă o cultură are ca punct de plecare o singură celulă, se observă după cîteva generații că celulele se află în stadii diferite ale ciclului lor de dezvoltare. Acest fenomen de încetinire și desincronizare a creșterii populațiilor bacteriene reprezintă un mare avantaj pentru asigurarea echilibrului dintre organismele vii în natură. Dacă procesul de diviziune s-ar desfășura numai în ritmul caracteristic pentru mediile de cultură favorabile (în medie cîte o diviziune la fiecare 20′), în interval de 48 de ore dintr-o singură bacterie ar deriva prin creștere exponențială $2{,}2 \times 10^{43}$ celule; cu toate că o celulă nu cîntărește decît 2×10^{-12} g, o asemenea cultură ar avea circa 24 000 000 000 000 000 000 000 000 tone, adică o masă de aproximativ de 4 000 de ori mai mare decît aceea a pămîntului.

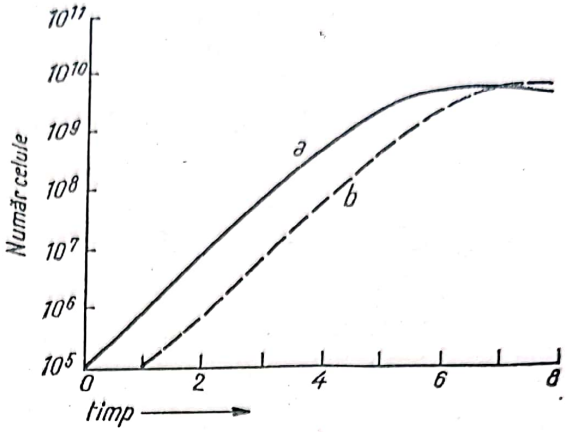


Fig. 181. Curba de multiplicare a bacteriei *E. coli* la temperatura de 37°C într-un mediu nutritiv bogat.

a — creșterea populației bacteriene după însămînțarea a 10^5 celule dintr-o cultură aflată în faza exponențială de multiplicare; *b* — creșterea după o perioadă de o oră, în cazul însămînțării unor celule dintr-o cultură mai veche.

Ritmul de creștere a bacteriilor este însă discontinuu, astfel că în condiții normale de cultură în bulion *E. coli* și alți aerobi ajung numai pînă la densitatea de 2×10^8 celule/ml, iar în culturi aerate și agitate continuu pînă la aceea de aproximativ 5×10^9 celule/ml (circa 1 g substanță uscată/litru). Deși nu se realizează indefinit, potențialul excepțional de multiplicare a bacteriilor explică supraviețuirea lor în natură, deseori în condiții defavorabile de mediu.

Creșterea unei populații bacteriene se poate aprecia direct prin mai multe metode, ca: determinarea greutății uscate a masei celulare, dozarea într-o cultură a unuia dintre constituenții bacterieni elementari — C sau N — aprecierea cantitativă a unei anumite enzime sau a unui produs metabolic și evaluarea numărului total al celulelor bacteriene (vii și moarte), cu ajutorul celulei microscopice de numărat, sau a numărului celulelor viabile (capabile de multiplicare) prin însămînțare pe medii de cultură solidificate. Ca metode indirecte se folosesc aprecierea gradului de turbiditate al suspensiei bacteriene într-un mediu lichid, în raport cu o scară etalon sau la fotocolorimetru, determinarea absorbției razelor U.V. cu lungimi de undă de 2 800 Å specifică pentru proteine sau 2 500 Å specifică pentru acizi nucleici etc.

Scanned with OKEN Scanner

3) *Faza staţionară maximală* urmează unei scurte perioade (de circa 2 ore), în care multiplicarea nu se mai produce în progresie geometrică, ci într-un ritm care scade progresiv. În această fază, numărul celulelor viabile este maxim şi rămîne constant o perioadă de timp care durează de la cîteva ore la cîteva zile, în funcţie de sensibilitatea bacteriilor la condiţii defavorabile de mediu. În cazurile în care intrarea culturilor în faza staţionară este determinată de epuizarea substanţelor nutritive din mediu, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al indivizilor populaţiei este constant şi egal cu numărul celulelor viabile. Atunci cînd este vorba de o lipsă parţială de substanţe nutritive sau de acumularea unor produşi toxici, multiplicarea persistă în ritm încetinit, dar este contrabalansată de o mortalitate cu ritm echivalent: numărul celulelor viabile rămîne constant, în timp ce numărul total al bacteriilor din cultură (atît vii cît şi moarte) creşte. În această fază, celulele bacteriene sînt considerate „mature", avînd morfologia descrisă drept caracteristică pentru fiecare specie: dimensiuni mai mici decît în faza de creştere exponenţială, citoplasma mai puţin omogenă datorită apariţiei de incluzii şi acumulării unor substanţe de rezervă, afinitate moderată, normală, pentru coloranţi şi prezenţa sporilor la speciile sporogene.

4) *Faza de declin* corespunde unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile, mergînd pînă la sterilizarea bacteriologică a culturii. La un moment dat, numărul bacteriilor viabile scade în progresie geometrică în raport cu timpul, datorită morţii unui număr foarte mare de celule. Uneori celulele viabile pot persista cîteva luni, multiplicîndu-se lent pe seama substanţelor nutritive liberate prin liza celulelor moarte. Celulele din această fază, celulele „bătrîne", au un polimorfism marcat, determinat de prezenţa formelor de involuţie (celule mici, sferice, umflate, deformate, gigante sau ramificate), se colorează foarte slab, uneori doar ca umbre, sau capătă chiar afinitate pentru coloranţii acizi, iar la speciile sporogene apar în cultură foarte mulţi spori. În unele cazuri se produc fenomene de autoliză, ceea ce determină scăderea numărului total de celule din mediu. În cursul acestei faze se produc în cultură modificări importante, care explică încetarea creşterii şi chiar moartea bacteriilor cum ar fi, de exemplu, scăderea concentraţiei sau chiar epuizarea totală a substanţelor nutritive esenţiale, diminuarea tensiunii O_2 sau scăderea concentraţiei compuşilor folosiţi în procesele respiratorii anaerobe, alterări fizico-chimice ale mediului prin apariţia de acizi şi alcooli rezultaţi din activitatea metabolică a bacteriilor şi acumularea produşilor de catabolism şi a toxinelor în concentraţii incompatibile cu viaţa celulelor.

Moartea celulelor dintr-o populaţie microbiană reprezentată printr-o cultură pură este un proces care evoluează exponenţial sau logaritmic, deoarece indivizii dintr-o asemenea populaţie reacţionează identic faţă de factorii letali exogeni. Ca urmare, într-un interval de timp dat, celulele mor într-o anumită proporţie, adică dacă moartea survine la o fracţiune constantă a populaţiei existente în acel moment, mortalitatea printre celulele supravieţuitoare se menţine la acelaşi nivel în fiecare din perioadele următoare de aceeaşi durată. De exemplu, dacă în primul minut mor 90% din celulele unei populaţii, în minutul următor din cele 10% celule rămase viabile vor muri iarăşi 90%,

Scanned with OKEN Scanner

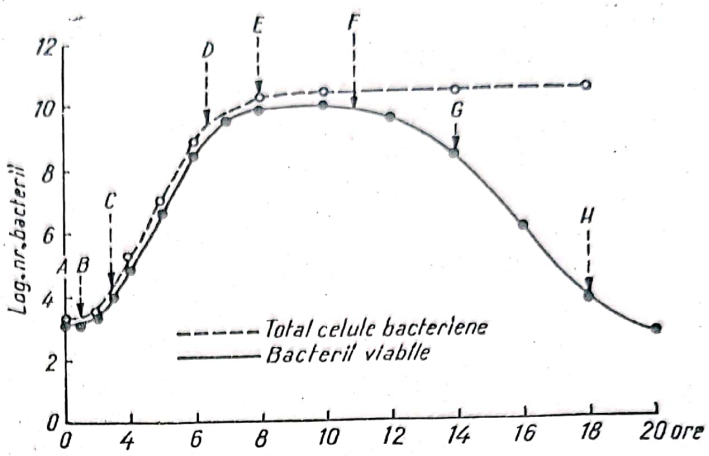


Fig. 182. Curba de creştere a unei populaţii bacteriene în raport cu timpul, exprimată prin logaritmul numărului de bacterii: *A* — însămînţarea; *A—B* — faza de lag; *B—C* — faza de accelerare a ritmului de creştere; *C—D* — faza de multiplicare logaritmică; *D—E* — faza de încetinire a ritmului de creştere; *E—F* — faza iniţială de declin; *G—H* — faza intermediară de declin; *G—H* — faza finală de declin.

astfel că, păstrînd ca nivel de raportare populaţia iniţială, după două minute de la începutul acţiunii letale mor în acest caz 99%, după trei minute 99,9%, după patru minute 99,99% din celule şi aşa mai departe.

Spre deosebire de organismele superioare, la care abolirea pentru o perioadă relativ scurtă a funcţiilor biologice şi a capacităţii de reproducere a celulelor componente determină fenomene de degradare cu caracter ireversibil, care determină moartea, la bacterii activităţile biologice pot fi parţial sau total suspendate pentru perioade foarte îndelungate, fără ca aceasta să provoace moartea celulelor. Astfel, deşi în spori şi în celulele congelate sau liofilizate activitatea biologică este practic oprită, capacitatea lor de a se reproduce imediat ce ajung în condiţii favorabile de mediu rămîne intactă. În acelaşi timp, la bacterii este posibilă şi situaţia inversă, în care pierderea capacităţii de reproducere nu este obligatoriu urmată imediat de încetarea activităţilor metabolice. Bacteriile expuse la acţiunea razelor X sau a unor toxice chimice îşi pierd capacitatea de multiplicare dar, sub toate celelalte raporturi, se comportă pentru un timp ca celule normale. Datorită acestui fapt se consideră ca mai corect să se aprecieze viabilitatea microorganismelor în raport cu conservarea potenţialului lor de reproducere. Celulele care potenţial mai sînt apte de a se reproduce sînt vii (sau cel puţin viabile), iar cele care au pierdut ireversibil această capacitate sînt moarte sau neviabile.

4. CULTURILE ŞI COLONIILE BACTERIENE

Rezultatul creşterii şi multiplicării bacteriilor într-un mediu nutritiv reprezintă cultura microbiană. Aspectul culturilor variază foarte mult nu numai în raport cu specia bacteriană, dar uneori şi în funcţie de modificările fizico-chimice ale mediului. În condiţii de laborator, pe lîngă faptul că se lucrează cu medii de cultură artificiale, compoziţia acestora se schimbă mereu, pe măsură ce cultura îmbătrîneşte, prin scăderea concentraţiei substanţelor nutritive şi acumularea de metaboliţi, uneori toxici.

Dezvoltarea bacteriilor pe medii solidificate cu gelatină sau cu agar se traduce prin formarea unor grămezi de milioane de bacterii, reprezentînd

Scanned with OKEN Scanner

coloniile bacteriene vizibile cu ochiul liber. O colonie de bacterii este rezultatul creşterii şi multiplicării la un loc, pe o zonă mică, de obicei circulară, a descendenţilor uneia sau mai multor celule aparţinînd aceleiaşi specii. Formarea ei se datoreşte faptului că pe medii solide şi semisolide mişcările browniene, ca şi mobilitatea bacteriilor, sînt în bună parte inhibate, ceea ce permite aglomerarea într-o arie limitată a celulelor derivate dintr-un şir de diviziuni succesive. Ca şi corpul unui organism pluricelular, colonia bacteriană reprezintă o populaţie celulară al cărei aspect exterior şi organizare interioară sînt determinate de proprietăţile specifice ale celulelor individuale şi de relaţiile reciproce dintre indivizii aflaţi în strînsă asociaţie.

La început, creşterea coloniei bacteriene se face exponenţial în raport cu timpul, ca rezultat al diviziunii bacteriei (sau bacteriilor) depuse pe suprafaţa mediului. După scurt timp, procesul de creştere se face mai lent şi mai puţin regulat, ca urmare a interacţiunilor complexe dintre membrii coloniei şi mediu. Pe măsură ce colonia creşte, între celulele ei se produce o adevărată competiţie pentru substanţele nutritive şi, pe de altă parte, intră în joc diverse influenţe negative legate de acumularea locală de produşi toxici de uzură. Ca atare, condiţiile de viaţă ale celulelor sînt variabile în funcţie de aşezarea lor în colonie. Celulele de la periferia coloniei vin în contact cu cantităţi mai mari de O_2 şi substanţe nutritive, în timp ce acelea situate central se găsesc uneori în condiţii de anaerobioză şi primesc substanţele nutritive care au putut difuza pînă la ele prin întreaga masă celulară. În ce priveşte accesibilitatea celulelor periferice şi centrale faţă de acţiunea produşilor toxici de uzură, care trebuie să difuzeze din celule şi din colonie spre exterior, situaţia este exact inversă. Între aceste extreme „teritoriale" se stabileşte un adevărat gradient de concentraţii de O_2, substanţe nutritive şi substanţe de uzură, datorită cărora condiţiile de viaţă ale membrilor coloniei acoperă o gamă largă de variante şi, ca urmare, ordinea în care celulele se divid este mult complicată de condiţiile complexe ale mediului capabile să le influenţeze potenţialul de multiplicare. Beneficiind de aerobioză, celulele de la perferia coloniei se multiplică activ, pe cînd cele din mijlocul ei pot chiar să fie moarte. Dezvoltarea coloniilor bacteriene este însă influenţată nu numai de interacţiunile celulelor lor individuale, ci şi de influenţa coloniilor vecine. Cînd sînt prea apropiate între ele pe suprafaţa unui mediu, coloniile se jenează reciproc prin sărăcirea rapidă a mediului în substanţe nutritive sau prin eliminarea de produşi toxici de catabolism. Datorită acestui fapt, coloniile dese pe suprafaţa gelozei sînt mici, în timp ce acelea care sînt mai rare ajung la dimensiuni mult mai mari. Colonia bacteriană reprezintă mai mult decît un simplu grup de celule îngrămădite în acelaşi loc. Ea are formă, textură, structură, mărime, consistenţă, culoare etc., însuşiri care sînt, în ansamblu, expresia proceselor complexe de creştere şi dezvoltare structurală, diviziune celulară şi interacţiune între membrii coloniei şi între aceştia şi condiţiile de mediu.

Forma şi structura coloniilor pe un anumit mediu de cultură sînt determinate de *morfologia celulelor individuale* şi de *gruparea lor* caracteristică, precum şi de acţiunea unor *factori fizico-chimici*, ca frecarea de suprafaţa mediului, întîlnirea unor obstacole mecanice, tensiunea superficială şi compoziţia chimică a mediului. În general, coloniile cu formă regulată şi diferenţiere structurală

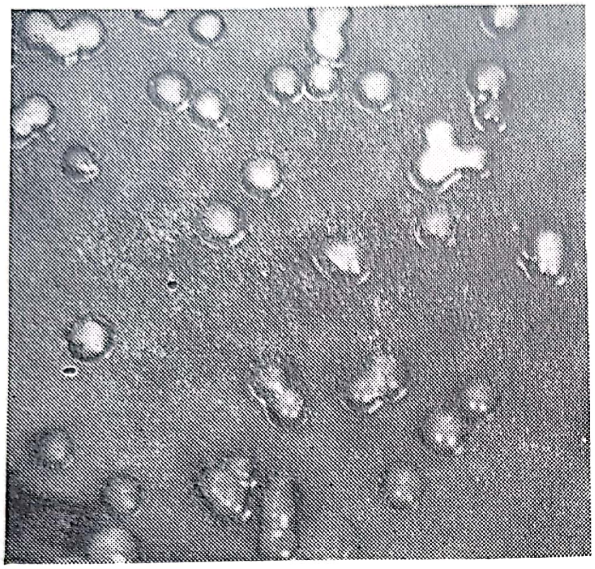


Fig. 183. Colonie bacteriană de tip „S".

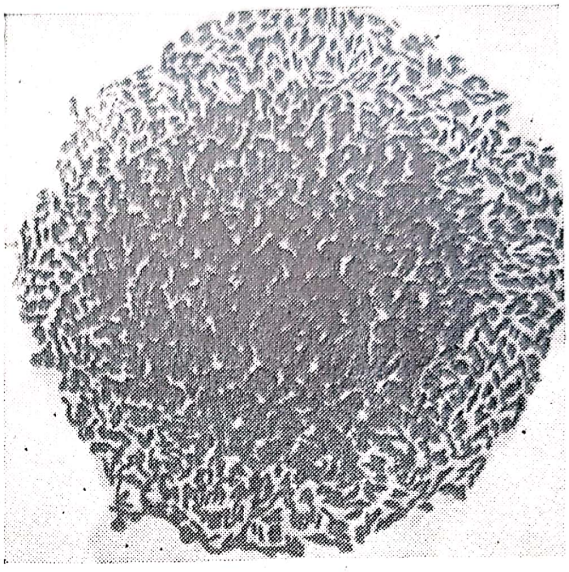


Fig. 184. Structura internă a unei colonii „S" examinată la microscop (după Knaysi).

minimă sînt formate din celule izolate sau grupate în perechi ori în lanțuri scurte, în timp ce acelea care au structuri mai variate și mai complicate sînt alcătuite din bacterii cu tendință de grupare în filamente. Aspectul morfologic al coloniilor, exprimat prin cîteva caracteristici structurale tipice și corespunzînd unor particularități morfo-funcționale definite ale tulpinilor microbiene, a permis stabilirea a două tipuri esențiale de colonii: „S" (netede) și „R" (rugoase).

Colonia de tip „S" (de la engl. *smooth*=neted) este rotundă, bombată, cu suprafața netedă și lucioasă, cu margini regulate. Zona marginală a coloniei

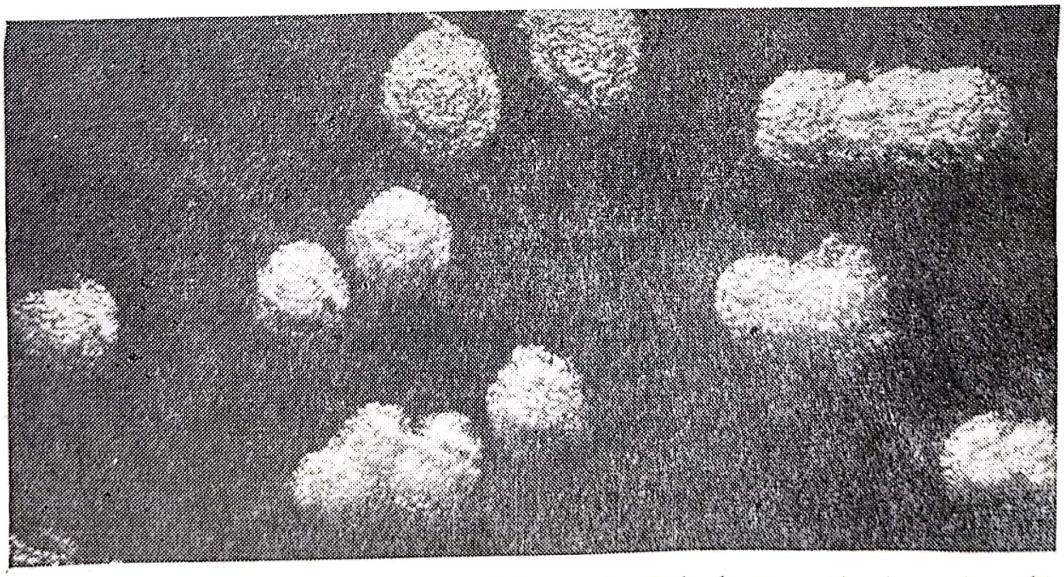


Fig. 185. Colonie bacteriană de tip „R" examinată la lupă cu iluminare laterală.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 186. Structura internă a unei colonii de tip „R" de *Streptococcus viridans* (după Knaysi).

constă dintr-un strat unic de celule sau din mai multe straturi în care celulele sînt orientate tangenţial sau neregulat. Ea prezintă o diferenţiere structurală minimă şi conţine celule dispuse izolat sau în grupuri mici (în diplo sau în lanţuri foarte scurte), cu tendinţă de aşezare paralelă. Bacteriile din coloniile „S" dau uşor suspensii omogene şi stabile în soluţie salină izotonică (NaCl 9‰), cresc repede în bulion, pe care-l tulbură uniform, sînt capsulate (în cazul speciilor capsulate); structura lor antigenică este completă, iar atunci cînd fac parte din specii patogene corespund — cu rare excepţii — formei virulente, cu putere patogenă şi rezistenţă la fagocitoză maxime.

Identificarea corectă a acestui tip de colonie este importantă în practică deoarece pentru lucrările de laborator se selecţionează de obicei coloniile „S".

Colonia de tip „R" (de la engl. *rough*=rugos) este plată, cu suprafaţa rugoasă, zbîncită şi cu marginile neregulate, dinţate, datorită creşterii ei rapide. Zona marginală a coloniei „R" este formată din lanţuri de celule lipite unele de altele, care merg paralel cu periferia ei şi care sînt întretăiate din loc în loc de lanţuri şi fasciole de filamente radiante sau oblice. Ea prezintă o diferenţiere structurală evidentă, datorită tendinţei celulelor de a creşte în lanţuri lungi sau în filamente care se îndoaie, formează bucle şi se încolăcesc atunci cînd se lovesc de un obstacol mecanic din mediu sau de alte filamente bacteriene. Filamentele bacteriene trec unele peste altele, se grupează în fasciole şi îşi schimbă reciproc direcţia. Bacteriile din colonia „R" dau suspensii neomogene şi instabile în soluţie clorurată izotonică, cresc mai greu în bulion, formînd un sediment la fundul tubului, sînt necapsulate (chiar dacă aparţin unei specii capsulate), au o structură antigenică degradată şi, dacă e vorba de specii patogene, corespund în general variantelor slab virulente sau avirulente şi cu slabă rezistenţă la fagocitoză.

Coloniile mobile. Unele colonii bacteriene au proprietatea de a se deplasa pe suprafaţa mediilor de cultură solide, cu o viteză de 0,5—1,4 rotaţii pe oră. În cazul coloniilor mici, viteza de migraţie poate ajunge pînă la 2,5 mm/minut. Mişcarea coloniilor se poate efectua prin rotaţie, în general în sens *levogir*, adică invers aceluia al acelor de ceasornic sau trigonometric, printr-o deplasare lentă înainte, sau prin *translaţie*. Fenomenul a fost observat la colonii normale, cît şi la microcolonii de 2—3 celule sau chiar la bacili izolaţi. Celulele care se deplasează lasă pe suprafaţa mediului o urmă corespunzătoare traiectoriei lor,

Scanned with OKEN Scanner

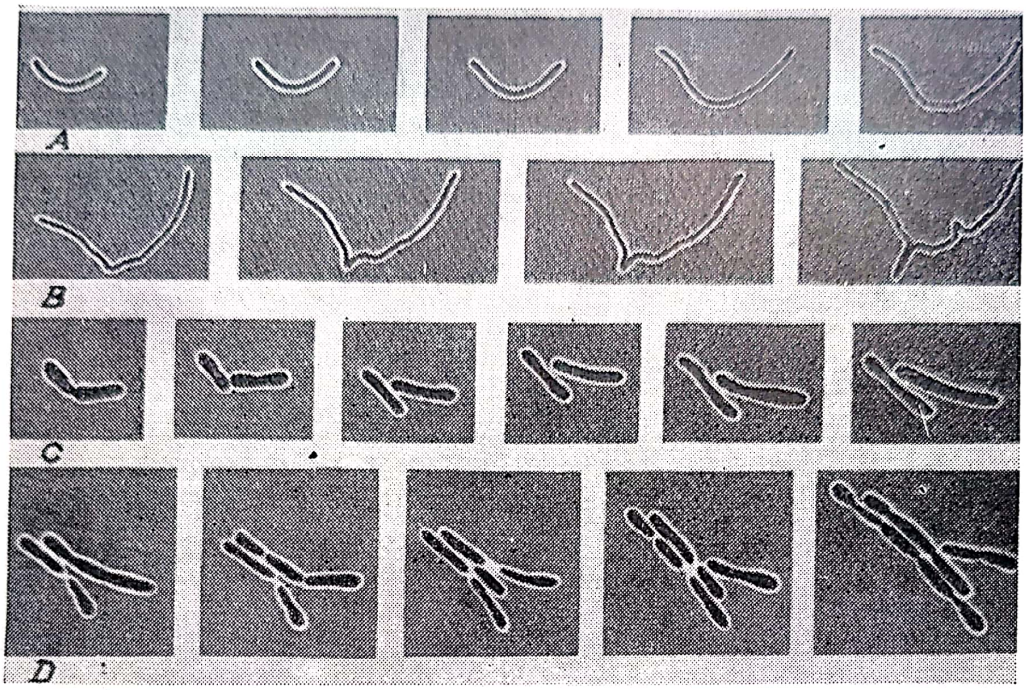


Fig. 187. Particularitățile de creștere ale celulelor bacteriene (*Bacillus* sp.) aparținînd variantelor „R" și „S":

A—B — celulele aparținînd tipului „R" au tendința de a crește în lanțuri lungi sau filamente; *C—D* — celulele de tip „S" au tendința de a crește izolat, alunecînd una pe lîngă alta (după Laseur).

sub forma unor șanțuri săpate în suprafața mediului. Cu foarte rare excepții, mobilitatea coloniilor este întîlnită numai la bacilii mobili cu spori deformanți, ca: *Bacillus circulans, B. sphaericus* var. *rotans, B. alvei, Clostridium septicum, Cl. oedematiens* etc. Mobilitatea coloniilor bacteriene este datorită prezenței la celulele individuale a unui aparat flagelar puternic, capabil ca, prin acțiunea simultană, să deplaseze o colonie întreagă ai cărei indivizi aderă slab de un mediu cu vîscozitate mare (geloza), datorită unui potențial electric redus al suprafeței corpului bacterian. Acest fenomen, care nu pare să aibă importanță în condiții naturale, poate să determine impurificarea culturilor în laborator, vehiculînd diferiți spori și bacterii pe suprafața mediului.

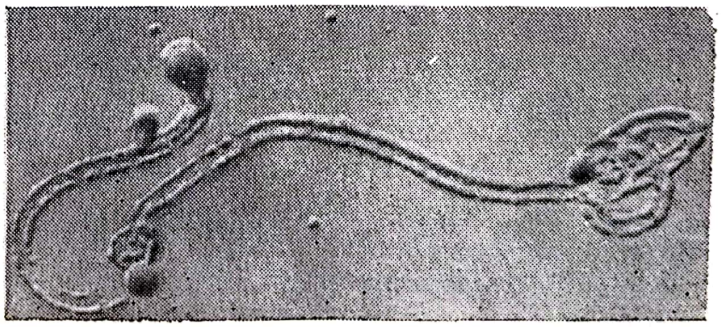


Fig. 188. Colonie bacteriană mobilă pe suprafața unei plăci cu geloză, avînd în apropiere cîteva colonii imobile (după Stanier).

Scanned with OKEN Scanner

INFLUENŢA FACTORILOR FIZICI ŞI CHIMICI DIN MEDIU ASUPRA MICROORGANISMELOR

Citoplasma microorganismelor este formată dintr-un ansamblu eterogen — uşor echilibrat — de diferite substanţe în stare coloidală sau cristaloidă, foarte sensibil la acţiunea diferiţilor agenţi externi. În condiţii favorabile de mediu, reacţiile metabolice implicate în procesele de creştere şi multiplicare se desfăşoară normal, în timp ce în urma unor acţiuni nefavorabile pentru aceste reacţii sau pentru substratele lor apar tulburări de diferite grade mergînd de la oprirea multiplicării, la trecerea în stare de viaţă latentă sau la modificări profunde ale echilibrului protoplasmatic, prin denaturări incompatibile cu viaţa ale substanţelor esenţiale componente (proteine, acizi nucleici). Activitatea biologică normală a microorganismelor este deci dependentă de condiţiile mediului extern şi atinge nivelul său maxim atunci cînd acestea sînt optime în raport cu necesităţile speciei. În general, mai rezistente la condiţii nefavorabile decît formele de viaţă superior organizate, microorganismele compensează printr-o mare capacitate de adaptare faptul că în natură condiţiile optime de viaţă se întîlnesc destul de rar.

Influenţa factorilor externi, fizici şi chimici asupra microorganismelor este în funcţie de intensitatea şi de durata acţiunii lor. Ţinînd seamă în special de mecanismul de acţiune al factorilor de mediu la nivel celular, separarea lor în agenţi fizici şi agenţi chimici apare deseori ca artificială; este totuşi utilizată curent pentru motive de ordin didactic.

1. ACŢIUNEA FACTORILOR FIZICI ASUPRA MICROORGANISMELOR

a. Temperatura de dezvoltare

Spre deosebire de temperaturile extreme care sînt nocive, temperaturile moderate permit desfăşurarea normală a proceselor metabolice şi, prin acestea, creşterea şi multiplicarea microorganismelor.

Ansamblul acestor valori termice reprezintă *zona temperaturilor de dezvoltare*, care este cuprinsă în limite restrînse (de exemplu, 35—40°C) la microorganismele *stenoterme* şi în limite foarte largi (de exemplu, 6—50°) la cele *euriterme*.

Scanned with OKEN Scanner

În această zonă, cuprinsă între —5 și 70—80°C, există valori care corespund respectiv temperaturii *minime*, *optime* și *maxime de dezvoltare* pentru o specie dată.

Temperatura minimă de dezvoltare reprezintă valoarea termică cea mai scăzută la care microorganismele se mai multiplică încă în mod evident. La această temperatură, metabolismul este scăzut, iar ritmul diviziunii celulare este mult încetinit, intervalul dintre două diviziuni ajungînd să fie la unele bacterii de circa 6 ore în loc de 15 minute. Limita ei inferioară este determinată teoretic de temperatura de congelare a apei, dar în mod practic se situează sub 0° (—5°) datorită faptului că punctul de congelare al constituenților celulari este mai scăzut decît acela al apei pure, datorită compușilor organici și minerali pe care ei îi conțin în soluție. În condiții particulare, care măresc zona de stabilitate fizică a apei celulare (conținutul ei bogat în diferite substanțe și presiunea osmotică ridicată), temperatura minimă tolerată de microorganisme poate să scadă pînă la —18°. Aceasta explică de ce anumite specii bacteriene se multiplică încă în apa mării la 0°, —5° și chiar la —11°, iar mucegaiurile și unele bacterii (*Pseudomonas*) pot crește la —18° în soluții concentrate de zahăr (sirop de fructe). La asemenea temperaturi foarte scăzute, toate reacțiile metabolice se desfășoară atît de lent încît creșterea și multiplicarea unei generații bacteriene durează săptămîni și chiar luni.

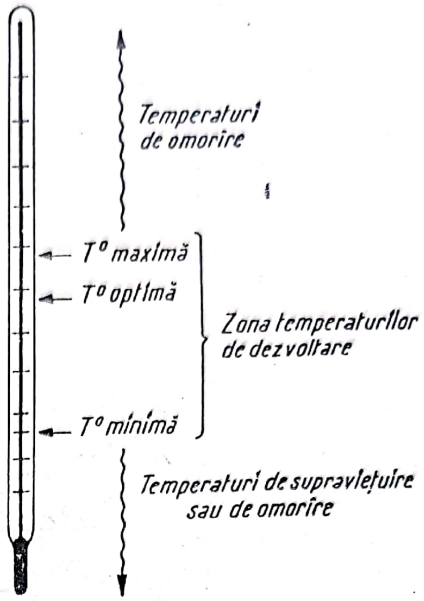


Fig. 189. Reprezentare diagramatică a influenței diferitelor limite de temperatură asupra microorganismelor (după Carpenter) (modificat).

Temperatura optimă de dezvoltare este definită convențional ca temperatura la care dezvoltarea populației microbiene de o specie dată se face în modul cel mai intens, adică are ca rezultat formarea celui mai mare număr de celule într-un timp dat. Această valoare nu coincide cu aceea a temperaturii optime pentru alte activități fiziologice ale celulei (tab. 10). De aceea numărul cel mai

TABELUL 10

VARIAȚIA TEMPERATURILOR OPTIME DUPĂ NATURA PROCESULUI BIOLOGIC
(după Dorn și Rahn)

Natura procesului biologic	Temperatura în grade Celsius	
	Streptococcus lactis	*Streptococcus thermophilus*
Viteza maximă de multiplicare	34	37
Număr maxim celule/ml	25—30	37
Viteza maximă de fermentație	40	47
Producerea de acid	30	37

Scanned with OKEN Scanner

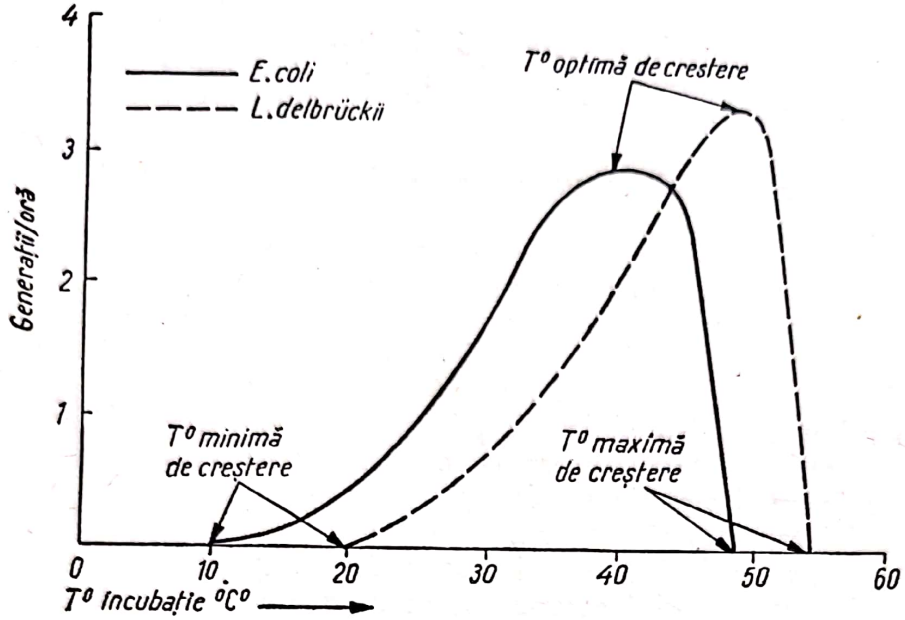


Fig. 190. Efectul temperaturii asupra vitezei de multiplicare la *Escherichia coli* şi *Lactobacillus delbrückii*.

mare de celule vii se acumulează nu atunci cînd diviziunea ca atare se face foarte rapid, ci dimpotrivă, în condiţiile unei diviziuni mai lente, datorită probabil diferenţelor de temperatură optimă între diversele acţiuni enzimatice implicate în procesul de multiplicare considerat în totalitatea lui, precum şi creşterii toxicităţii produşilor de catabolism la temperaturi ridicate. În mod similar, viteza de fermentaţie sau de acumulare a unui anumit produs de metabolism este maximă la anumite temperaturi, care nu coincid obligatoriu cu temperatura

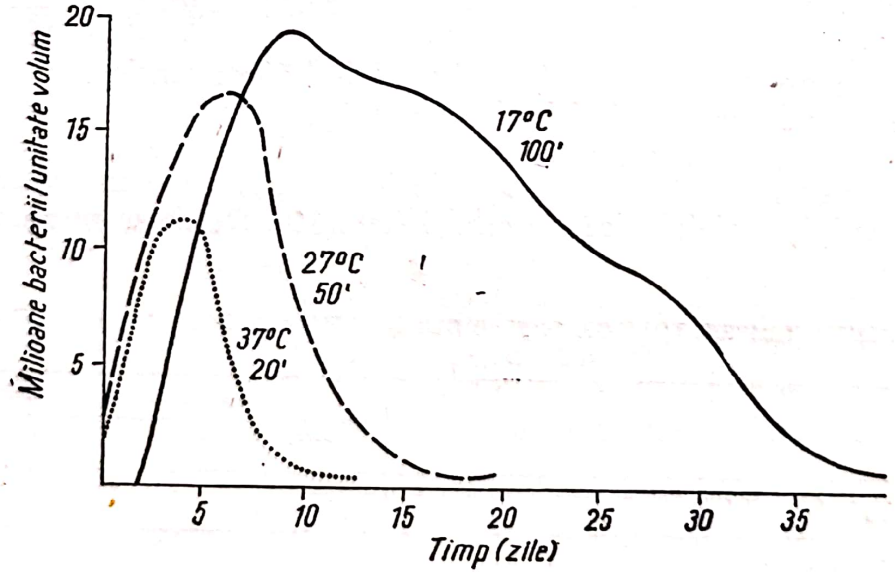


Fig. 191. Efectul temperaturii asupra cantităţii de masă microbiană de *Staphylococcus aureus*, formată în raport cu timpul. Cifrele indică durata generaţiei pentru fiecare temperatură (după Graham-Smith).

Scanned with OKEN Scanner

optimă pentru diviziunea celulară. Nu se poate vorbi, prin urmare, în mod absolut, despre o temperatură optimă „în general" pentru o anumită specie, ci de o temperatură optimă pentru fiecare dintre activitățile ei biologice. Pe de altă parte, temperatura optimă de dezvoltare nu reprezintă media aritmetică a valorilor minime și maxime tolerate, ci se apropie mai mult de valorile maxime.

Temperatura maximă de dezvoltare reprezintă valoarea cea mai ridicată la care activitatea biologică a unui anumit microorganism este încă posibilă, iar multiplicarea sa se mai poate face în mod evident. Această valoare limitată de termolabilitatea proteinelor și acizilor nucleici, este de obicei cu 10—15°C mai mare decît temperatura optimă pentru microorganismul respectiv.

În condiții particulare, unele bacterii ca cele sulfat-reducătoare termofile izolate din depozite subterane de mare profunzime (circa 1 600—3 200 m la 200—400 atm.) se mai reproduc și eliberează H_2S chiar la 104°C, dacă sînt supuse la o presiune de 1 000 atm. După Zo Bell, această comportare este explicabilă prin efectul protector al presiunilor mari față de celula bacteriană expusă la temperaturi ridicate.

Preferințele termice diferite și particularitățile de termotoleranță sînt rezultatul adaptării microorganismelor la mediu, realizată prin mutație și selecție naturală sub acțiunea unor factori caracteristici esențiali ai habitatului lor natural (tab. 11).

Microorganismele pot fi grupate în trei categorii, în funcție de temperatura lor de dezvoltare.

a) *Microorganismele criofile* sau *psichrofile* cresc cel mai bine la temperaturi scăzute; ele trăiesc în izvoarele reci, în lacuri și mări, în regiunile de altitudine și polare. Aceste microorganisme au un mare interes economic, deoarece pot altera diferitele produse alimentare conservate prin frig.

TABELUL 11

TEMPERATURILE DE DEZVOLTARE ALE UNOR MICROORGANISME ÎN RAPORT CU HABITATUL LOR

Specia	Habitat	Temperatura de dezvoltare (°C)		
		minimum	optimum	maximum
Pseudomonas gelatica	Mări și oceane	0	20—25	30—32
Pseudomonas pisi	Sol de grădină	7	28	37
Bacillus subtilis	Sol, substanțe vegetale în descompunere	8	28—40	50—55
Escherichia coli	Intestin vertebrate	8—10	37	47
Neisseria meningitidis	Nazofaringe om	25	36—37	40
Mycobacterium tuberculosis	Organism uman	30	37	40
Clostridium thermocellum	Sol, nămol marin, intestin animale	50	60	68
Bacillus stearothermophilus	Sol, produse alimentare contaminate	30	50—65	70
Saccharomyces ellipsoideus	Sol, suprafață plante	0	30—35	40
Chladosporium herbarum	Sol	0	28	37

Scanned with OKEN Scanner

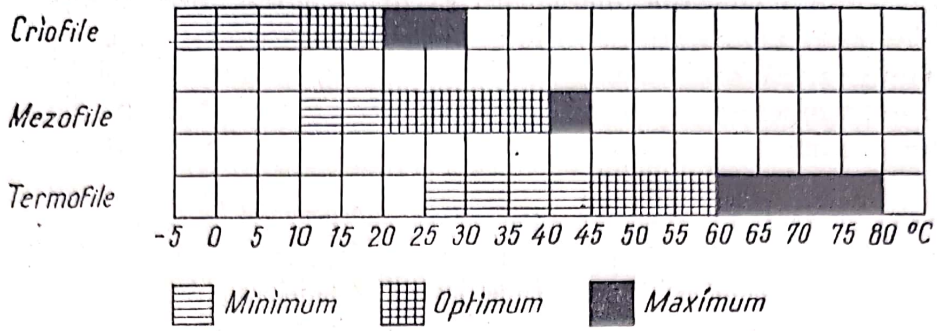


Fig. 192. Clasificarea microorganismelor după temperaturile lor de dezvoltare.

b) *Microorganismele mezofile* se dezvoltă cu predilecţie la temperaturi medii (10—45°C); ele fac parte din microflora normală a animalelor homeoterme faţă de care se comportă atît ca saprofite, cît şi ca parazite.

c) *Microorganismele termofile* se dezvoltă normal în apele termale, gunoi şi bălegar, temperaturile lor optime de dezvoltare depăşind 60°C şi, în cazuri extreme, chiar 85—88°C (B r o c k).

Mecanismul chimic al toleranţei la temperaturi mari nu este bine cunoscut. După unii autori, constituenţii celulari esenţiali ai termofililor ar fi relativ mai termostabili decît aceia ai mezofililor, graţie unei structuri neobişnuite a proteinei lor sau stării ei fizico-chimice speciale care ar permite şi chiar ar favoriza activităţile biologice celulare la temperaturi care în mod obişnuit inactivează proteina altor organisme; unele enzime ale microorganismelor termofile ar fi, de asemenea, relativ termostabile. După G a u g h r a n, termofilia ar fi legată de capacitatea de resinteză rapidă a constituenţilor celulari distruşi sub acţiunea temperaturii ridicate. În sfîrşit, s-au constatat unele particularităţi de structură chimică la bacteriile termofile: fosfolipidele *B. stearothermophilus* sînt formate aproape integral din sfingomieline, care au un punct de topire ridicat în raport cu acela al fosfolipidelor din celula mezofililor.

Acţiunea temperaturilor supramaximale asupra microorganismelor. Temperaturile ridicate dincolo de limitele maxime tolerabile omoară majoritatea microorganismelor, ceea ce a determinat folosirea acţiunii lor pentru sterilizarea diferitelor obiecte sau medii în microbiologie, medicină, industria alimentară, chimico-farmaceutică etc.

Efectul microbicid al căldurii este atribuit în primul rînd *denaturării proteinelor celulare* şi în special a enzimelor. Curba logaritmică a morţii bacteriilor sub acţiunea căldurii şi coeficientul ridicat de celule moarte la temperaturi înalte constituie principalele argumente în favoarea acestei concepţii, deoarece reflectă procesul de denaturare a proteinelor, care se produce ca o reacţie de ordin monomolecular, evoluînd în conformitate cu legea acţiunii maselor. La aceasta, în cazul microorganismelor aerobe, s-ar adăuga efectul accesoriu al *asfixiei* determinat de o insuficienţă acută de oxigen, rezultînd din creşterea nevoii de O_2 a celulelor şi reducerea concomitentă a solubilităţii lui

Scanned with OKEN Scanner

în mediu sub acțiunea temperaturii ridicate. Efectul letal al expunerii la căldură ar putea fi datorat, în plus, și unei intoxicații celulare legată de faptul că ridicarea temperaturii accelerează reacțiile metabolice, determinînd acumularea de produși toxici într-un ritm superior aceluia în care ei pot fi eliminați. Asfixia și efectul toxic ar avea însă un rol secundar în omorîrea prin căldură a microorganismelor: este probabil ca ele să se manifeste cu eficacitate numai la temperaturi relativ moderate, dat fiind că viteza morții bacteriilor la temperaturi ridicate este prea mare pentru a putea fi determinată de procese de asfixie sau de intoxicație care comportă o durată mai lungă de acțiune.

Cu excepția temperaturilor foarte ridicate, moartea unei populații bacteriene nu este instantanee ci se produce treptat, ceea ce permite evidențierea unor factori care influențează sensibilitatea bacteriilor la căldură și anume: particularitățile de *specie, gradul de umiditate, pH-ul* și *compoziția chimică a mediului, numărul inițial de germeni, durata expunerii* etc.

Ca regulă generală, formele vegetative sînt mult mai sensibile decît sporii, iar umiditatea crescută mărește sensibilitatea la căldură ca rezultat al hidratării celulare care favorizează coagularea proteinelor. Deoarece acțiunea căldurii nu afectează simultan toți germenii expuși, ci decurge succesiv ca un proces continuu, distrugerea unei populații celulare abundente necesită prelungirea timpului de expunere la temperatura dată sau ridicarea temperaturii cu menținerea nemodificată a duratei de expunere. În sfîrșit, scăderea *p*H-ului mărește sensibilitatea bacteriilor față de acțiunea letală a căldurii (tab. 12).

TABELUL 12

NUMĂRUL DE MICROORGANISME SUPRAVIEȚUITOARE DUPĂ DIFERITE INTERVALE DE TIMP LA TEMPERATURA DE 100°C

(după Frobisher)

Durata expunerii (minute)	Nr. microorganismelor supraviețuitoare/ml	Durata expunerii (minute)	Nr. microorganismelor supraviețuitoare/ml
—	90 000 000	15	1 000 000
5	22 000 000	20	200 000
7	8 000 000	25	20 000
9	5 000 000	30	—
11	3 000 000	—	—

Sensibilitatea microorganismelor față de efectul letal al temperaturilor ridicate este apreciată convențional prin doi indicatori care reflectă temperatura letală și durata ei de acțiune:

— *Punctul termic mortal* reprezintă temperatura la care sînt omorîte în 10 minute toate celulele unei specii date. El se determină expunînd bacteriile la diferite temperaturi (de exemplu, 50, 60, 70°C...), timpul de expunere rămînînd invariabil de 10 minute. Inexact ca terminologie, deoarece nu toate celulele mor în același timp în cursul acestui interval, acest indicator exprimă

Scanned with OKEN Scanner

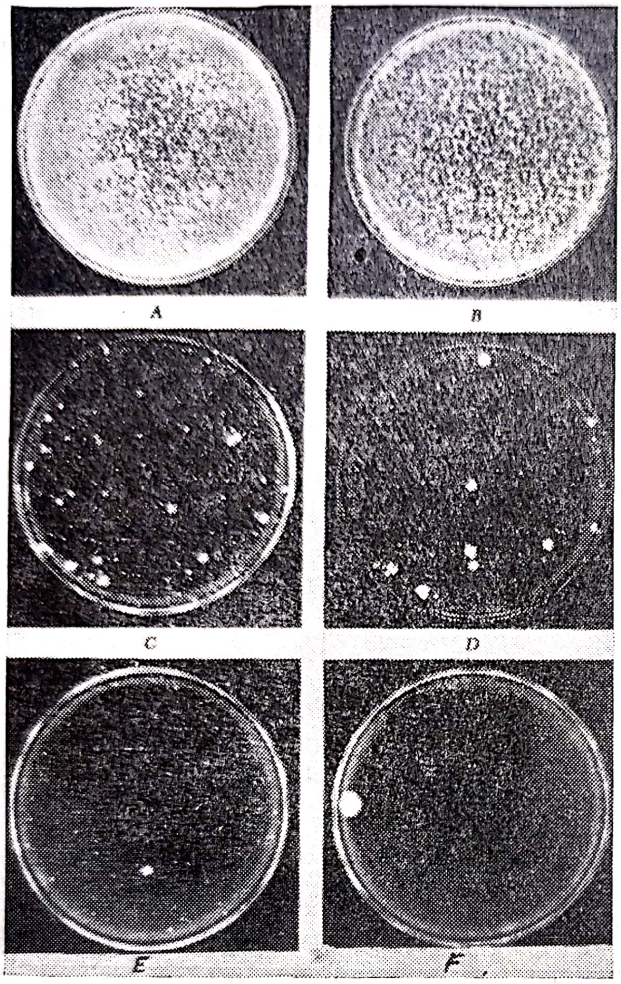


Fig. 193. Determinarea punctului termic mortal la *Bacillus cereus* prin încălzirea a 1 ml cultură bacteriană 10′ la 75° (*A*), 80° (*B*), 85° (C), 90° (D), 95° (E) şi 100° (F), urmată de dispersarea pe plăci Petri conţinînd mediu de cultură cu agar (după Salle).

în realitate temperatura la care moare ultimul supravieţuitor dintr-o populaţie al cărei număr a scăzut continuu în cursul perioadei de expunere.

— *Timpul termic mortal* exprimă durata de expunere necesară pentru a omorî toate celulele la o temperatură dată. El se determină prin expuneri cu durată variabilă (1′, 2′, 5′, 10′, 15′...) la o anumită temperatură constantă.

În stabilirea ambilor indici se are în vedere raportarea la o concentraţie definită de germeni şi la un mediu cu *p*H cunoscut.

În realitate, sensibilitatea bacteriilor la temperaturi ridicate este apreciată cel mai corect prin corelarea celor doi indici, deoarece cu cît temperatura este mai ridicată, cu atît durata expunerii cu efect letal este mai mică şi invers.

Acţiunea temperaturilor subminimale asupra microorganismelor. În mod obişnuit se consideră că microorganismele suportă temperaturi extrem de scăzute, cum ar fi chiar aceea de îngheţare a aerului lichid (—190°) sau a heliului lichid (—250°C). În realitate, expunerea la temperaturi atît de joase este nocivă, însă din populaţia microbiană totală rămîn totdeauna cîteva celule viabile, capabile de multiplicare în condiţii favorabile. În anumite limite (2°—8°C), temperaturile scăzute provoacă numai o anumită reducere a vitezei metabolismului, ceea ce determină o stare de viaţă semilatentă, permiţînd conservarea un timp mai îndelungat a viabilităţii celulelor.

În cursul proceselor de îngheţare lentă, se produc nuclee de cristalizare a apei în afara celulelor, antrenînd o creştere a presiunii osmotice extracelulare cu pierderea consecutivă de apă din celule. În cazul îngheţului rapid, tendinţa de cristalizare a apei extracelulare este mult mai mică, dar se produce, în schimb, cristalizarea apei intracelulare. Dacă îngheţarea este bruscă, adică extrem de rapidă, cristalizarea intracelulară este împiedicată de trecerea apei din celulă într-o stare amorfă, vitroasă (cu structura sticlei).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 13

INFLUENȚA ÎNGHEȚULUI CONTINUU ȘI A ÎNGHEȚULUI ȘI DESGHEȚULUI REPETATE ASUPRA NUMĂRULUI DE CELULE/ml LA *SERRATIA MARCESCENS*
(după Hillard)

Îngheț continuu		Îngheț-desgheț repetate	
Celule viabile/ml		Celule viabile/ml	
Inoculum	340 000	Inoculum	340 000
După 24 ore	36 000	Îngheț 2×	2 600
După 30 ore	32 000	Îngheț 3×	280
După 48 ore	14 000	Îngheț 4×	15
După 96 ore	4 900	Îngheț 5×	0

Moartea celulei în urma înghețării este determinată de acțiunea asociată a trei factori: *a*) denaturarea structurilor celulare prin deshidratarea lor; *b*) pierderea prin plasmoliză sau îngheț a apei cu rol de solvent, ceea ce determină o concentrare a electroliților în celulă („moartea prin sare"); *c*) producerea de leziuni mecanice (striviri sau înțepături) ale celulelor sub acțiunea cristalelor de gheață intra- sau extracelulare.

Conservarea prelungită prin frig, ca și dezghețul lent, sînt de asemenea nocive; viabilitatea celulei este îndeosebi compromisă de înghețul și dezghețul repetate (tab. 13).

După Meyer, în medii cu salinitate ridicată (de 14 ori mai mare decît cea a mării) și cu un conținut mic în substanțe organice, unele microorganisme ca *B. megaterium*, *Micrococcus* sp., *Corynebacterium* sp. sînt protejate de acțiunea temperaturilor scăzute, astfel că se pot dezvolta chiar la —5 pînă la —24°C în apele Antarcticei rămase neînghețate din cauza salinității.

Liofilizarea. Capacitatea microorganismelor de a rezista și de a-și conserva timp îndelungat viabilitatea atunci cînd suferă, în anumite condiții, acțiunea unor temperaturi foarte scăzute, le face accesibile procedeului de conservare prin uscare în vid, precedată de congelare la temperaturi joase (—30°, —80°C). Acest procedeu, denumit *liofilizare*, este aplicat în practică pentru conservarea culturilor microbiene și a diferitelor alte produse biologice (preparate enzimatice, extracte celulare, toxine, antibiotice etc.). El asigură o conservare îndelungată (timp de ani sau zeci de ani) în vid sau în prezența unui gaz inert (argon).

Deși în cazul culturilor microbiene această modalitate de conservare se însoțește de o diminuare a numărului de celule viabile, în mod obișnuit rămîn totdeauna cîteva celule capabile să inițieze dezvoltarea unei culturi. Asocierea congelării la uscare are scopul de a diminua nocivitatea desicației, determinînd modificări ale citoplasmei similare celor care în mod natural însoțesc sporularea. Produsul final al liofilizării este o pulbere foarte solubilă în diferite lichide (de la gr. *lio*=lichid; *filein*=a atrage).

Scanned with OKEN Scanner

b$_2^2$ Energia radiantă

Radiaţiile electromagnetice au un spectru larg în care sînt incluse radiaţiile herziene, infraroşii, vizibile, ultraviolete (UV), X şi γ, caracterizate fiecare printr-o anumită lungime de undă. Ele au un dublu caracter: de fenomen ondulatoriu şi de fascicul discontinuu de mici cuante de energie. Iradierea reprezintă un bombardament cu fascicule de cuante de energie, iar efectele ei asupra materialului iradiat sînt determinate de absorbţia de către acesta a energiei radiaţiilor şi depind de energia cuantei şi de natura materialului absorbant.

— *Radiaţiile herziene* ca şi cele *infraroşii*, cu lungime de undă mare (λ peste 12 000 Å), au un conţinut energetic atît de slab încît sînt incapabile să modifice chimic substanţele care le absorb şi, ca atare, energia lor este imediat convertită în căldură. Radiaţiile cuprinse între 12 000 Å (*infraroşu apropiat*) şi 2 000 Å (*ultraviolet îndepărtat*) au un conţinut energetic suficient de ridicat pentru a produce modificări fotochimice ale moleculelor de care sînt absorbite. În sfîrşit, radiaţiile cu λ sub 2 000 Å (X, γ şi cosmice) au un conţinut energetic atît de ridicat încît provoacă ionizarea moleculelor pe care le întîlnesc, de unde şi denumirea lor de radiaţii *ionizante*.

Efectul biologic al radiaţiilor depinde de lungimea lor de undă şi de doza de iradiere (cantitatea totală de energie incidentă). În funcţie de aceşti doi factori, iradierea poate avea două efecte distincte asupra celulelor microbiene:

Efectul letal, reprezentînd omorîrea într-o dinamică logaritmică a celulelor microbiene, în sensul că în fiecare interval succesiv de timp ele mor într-un procent care rămîne constant.

Efectul mutagen, care constă în modificarea unor caractere genotipice, survenind de obicei la o parte din celulele unei populaţii microbiene şi manifestîndu-se prin apariţia la aceste celule a unor însuşiri fenotipice noi, cum ar fi rezistenţa la un bacteriofag, capacitatea de sinteză a unui metabolit esenţial sau, dimpotrivă, inaptitudinea de a mai sintetiza un anumit metabolit etc.

— *Radiaţiile luminoase* acţionează asupra celulelor prin intermediul unor reacţii fotochimice cu constituenţii celulari. Dintre aceste reacţii, cel mai bine

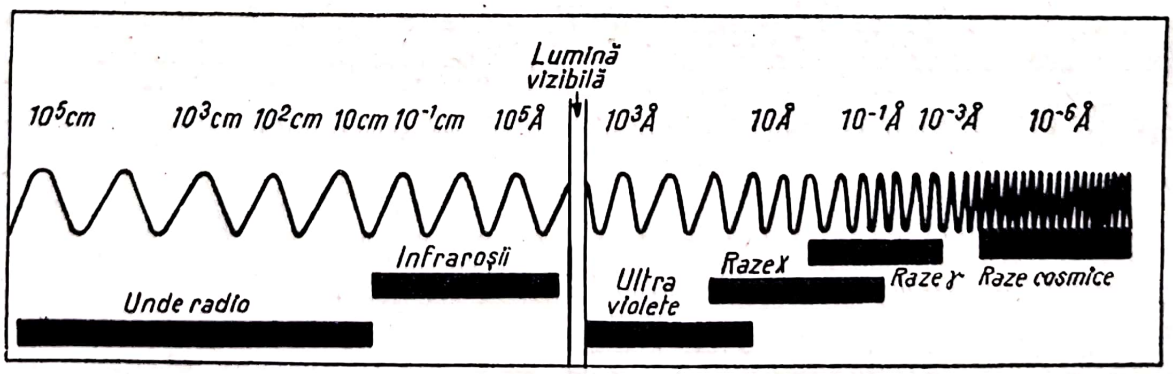


Fig. 194. Spectrul electromagnetic al energiei radiante cu lungimile de undă (λ) ale diferitelor tipuri de radiaţii, exprimate în Å şi cm (după R. C. A.) (modificat).

Scanned with OKEN Scanner

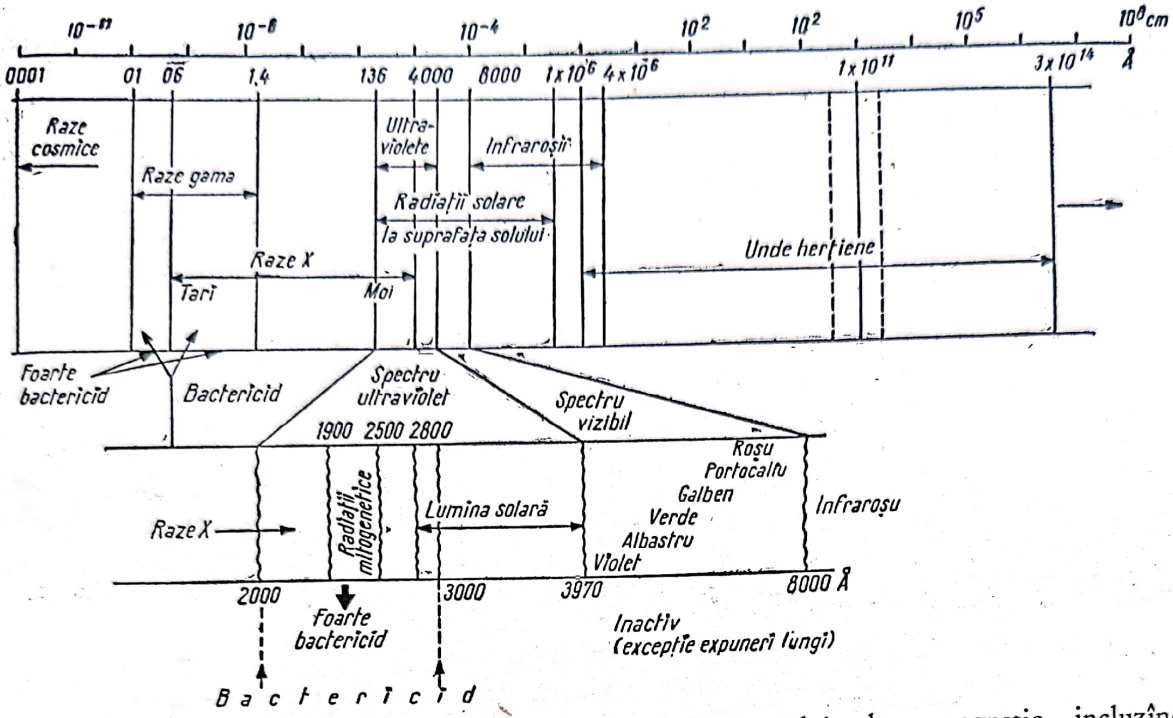


Fig. 195. Reprezentare detaliată a unei porțiuni a spectrului electromagnetic, incluzînd radiațiile cu efecte importante din punct de vedere biologic.

studiate sînt cele implicate în procesul de *fotosinteză* și în fenomenele de *fototaxie* întîlnite la microorganismele fototrofe (bacterii și alge).

Lumina solară directă este bactericidă, datorită probabil nu atît acțiunii radiațiilor UV, cît mai ales încălzirii prin radiațiile infraroșii și deshidratării consecutive a celulelor expuse; într-adevăr, deși soarele este o sursă puternică de UV, stratul de ozon din partea superioară a atmosferei absoarbe majoritatea radiațiilor cu o lungime de undă mai mică de 2 900 Å.

În plus, lumina vizibilă exercită și efecte cu caracter mai specific, independent de componența calorică sau ultravioletă a luminii solare, dintre care unele sînt însă condiționate de o iradiere ultravioletă concomitentă sau prealabilă.

1) *Fotosensibilizarea* reprezintă fenomenul de intensificare a efectului biologic al radiațiilor luminoase, ca urmare a prezenței în mediul extracelular a unor substanțe, inactive la întuneric, care sînt activate în prezența luminii.

2) *Fotoprotecția* constituie rezultatul biologic al acțiunii antagoniste a radiației luminoase față de efectele unui iradieri simultane cu ultraviolete; modificările celulare caracteristice pentru iradierea cu UV sînt atenuate sau chiar prevenite printr-o expunere concomitentă la radiațiile din spectrul luminii vizibile.

3) *Fotoreactivarea* este procesul de restaurare, de revenire la normal a unor celule expuse în prealabil la radiații UV, realizat sub acțiunea luminii vizibile, care este capabilă să „repare" alterările celulare consecutive iradierii cu ultraviolete. Printr-un mecanism rămas necunoscut, un număr de indivizi dintr-o

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 196. Fenomenul de reactivare (după Kelner). Celule de *E. coli* iradiate după însămînţare cu o doză letală de U. V. sînt expuse la acţiunea luminii vizibile pe o zonă limitată a plăcii, corespunzînd imaginii filamentului de tungsten al unui bec electric. După incubare, cultura s-a dezvoltat abundent în această zonă datorită fenomenului de fotoreactivare; în restul plăcii au crescut numai cîteva colonii care au supravieţuit iradierii.

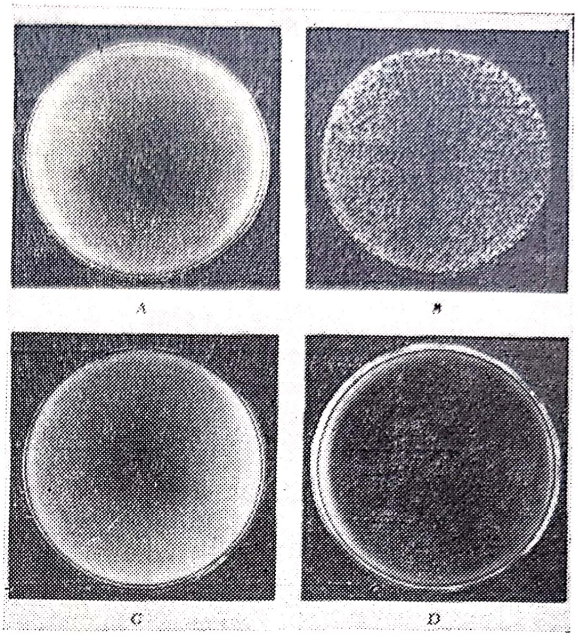


Fig. 197. Acţiunea radiaţiilor ultraviolete asupra bacteriilor: *sus* — sterilizarea incompletă (datorită prezenţei sporilor) a unei culturi de *Bacillus subtilis*, provenită din suspensii expuse o oră (*A*) şi 2 ore (*B*) la U. V.; *jos* — sterilizare parţială după o oră (*C*) şi totală după 2 ore (*D*) a unei culturi de *Staphylococcus aureus*.

populaţie bacteriană iradiată letal cu UV „reînvie" în urma expunerii acesteia la lumină în următoarele trei ore.

— *Radiaţiile ultraviolete* au o acţiune antimicrobiană netă, al cărei efect depinde de intensitatea şi durata iradierii. În cazul unei iradieri slabe şi de scurtă durată, se produc fie alterări mai mult sau mai puţin limitate la nivelul materialului genetic — care se traduc prin apariţia unor mutaţii sau prin pierderea eventualului caracter de lizogenie al celulei bacteriene, care din această cauză suferă liza bacteriofagică însoţită de eliberarea fagului pînă atunci încorporat ca profag în genomul său, fie o inactivare reversibilă a unor procese metabolice, ceea ce are ca rezultat blocarea temporară a multiplicării celulare. În urma unei iradieri intense, în celulă survin modificări profunde, ireversibile, cu efect letal.

Radiaţiile cuprinse între 2 300 şi 2 800 Å sînt cele mai active din punct de vedere biologic, efectul microbicid cel mai puternic fiind al celor cu lungimea de undă de aproximativ 2 600 Å (mai precis 2 537 Å) corespunzătoare radiaţiilor emise de lămpile de laborator bactericide (sterilizante).

Spectrul de acţiune antimicrobiană al UV seamănă foarte mult cu spectrul de absorbţie al UV de către ADN, ceea ce a sugerat de la început ipoteza dezvoltată în teoria „ţintei", conform căreia efectul iradierii se exercită exclusiv

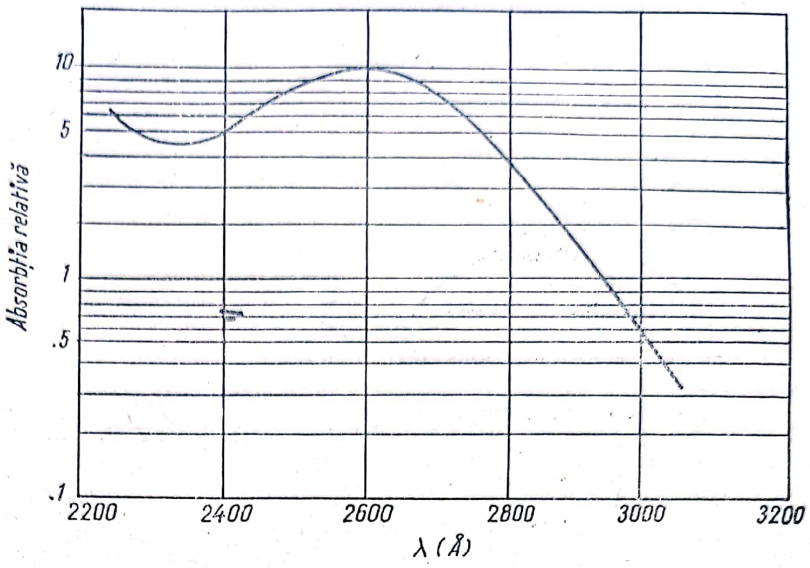


Fig. 198. Spectrul de absorbţie al radiaţiilor ultraviolete de către moleculele de ADN. Graficul arată capacitatea ADN de a absorbi radiaţii cu diferite lungimi de undă (λ). Absorbţia maximă corespunde radiaţiilor cu λ = 2 600 Å, recunoscute ca fiind cele mai dăunătoare pentru celula vie.

sau în cea mai mare parte prin intermediul ADN: radiaţiile ar lovi direct acest constituent celular şi ar determina reacţii fotochimice selective cu bazele din structura lui, deşi întreaga celulă este expusă acţiunii lor. Marmur şi Grossman au arătat că în urma expunerii la UV, cele două catene ale moleculei de ADN sînt mai solid legate, datorită înlocuirii legăturii slabe naturale — puntea de H — cu o legătură puternică de tip nou — legătura dimer — care uneşte două unităţi de timină de pe lanţurile opuse ale dublei helice.

Formarea dimerilor de timină, sub acţiunea iradierii cu ultraviolete, are o mare importanţă biologică, deoarece, după ipoteza acceptată azi, replicarea moleculei de ADN este iniţiată prin desfacerea legăturii de H, după care de-a lungul fiecărei catene vechi se constituie o catenă nouă complementară. Substituirea punţii de H printr-o legătură solidă de tip dimer întrerupe separarea celor două catene, blocînd astfel replicarea ADN, ceea ce se traduce în cele din urmă printr-un efect letal sau, determinînd o replicare incorectă, cu apariţia unei secvenţe alterate de baze în lanţul nou format. Legătura dimer se poate constitui şi între două timine adiacente, ceea ce determină oprirea replicării sau, mai ales, alterarea secvenţei bazelor la acest nivel în lanţul nou format. Replicarea ulterioară a unui lanţ alterat din punctul de vedere al secvenţei bazelor va duce la formarea unor molecule ADN cu secvenţe alterate în ambele lanţuri ale dublei molecule, adică la apariţia unor gene mutante.

— *Radiaţiile corpusculare* (sau particulate) ca razele α, β, protonii şi deuteronii, ca şi *radiaţiile electromagnetice* γ şi X produc efecte legate de bombardarea generală a celulei, absorbţia selectivă a radiaţiilor de către anumite structuri moleculare specifice, jucînd în acest caz un rol mai mic sau nul. Cînd întîlnesc în calea lor un microorganism, particulele active „lovesc" succesiv o serie de atomi din structura lui, desprinzînd şi smulgînd electroni de pe orbitele respective; se creează în felul acesta coloane de ionizare intensă care determină alterarea sau distrugerea unor substanţe esenţiale pentru celulă,

Scanned with OKEN Scanner

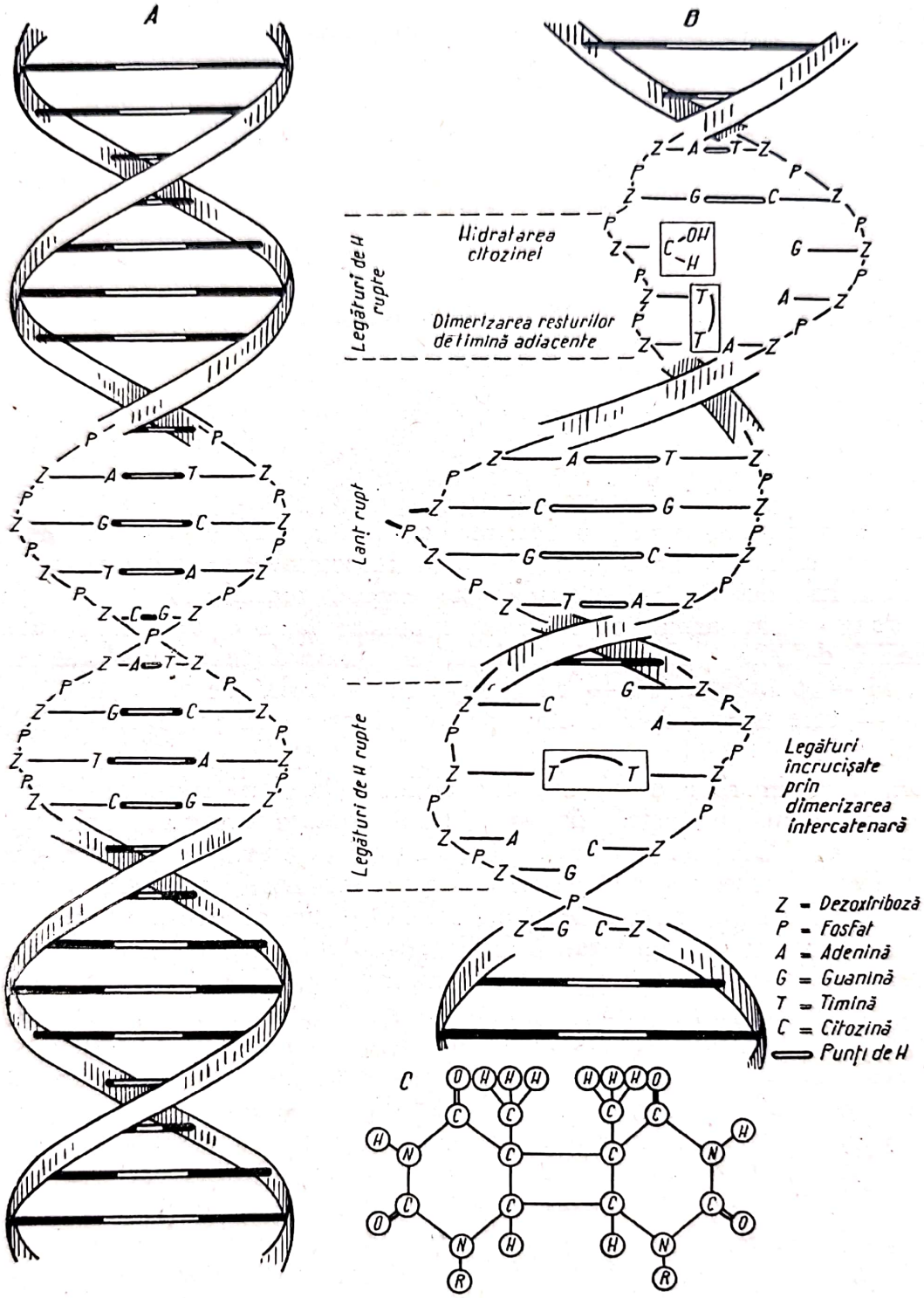


Fig. 199. Alterările moleculei ADN sub acțiunea radiațiilor ultraviolete:
A — moleculă normală de ADN; *B* — diferite tipuri de denaturări cu importanță biologică; *C* — structura chimică a dimerului de timină, a cărui formare este în special răspunzătoare de denaturarea virusurilor și a microorganismelor.

Scanned with OKEN Scanner

blocarea a diferite sinteze, inhibiţia procesului de diviziune etc. Datorită efectului lor specific, aceste radiaţii sînt calificate generic ca *ionizante*, spre deosebire, de exemplu, de razele UV care nu transformă atomul în ion, deoarece nu pot să-i smulgă un electron, ci determină numai „excitarea" atomului, adică trecerea lui la un nivel superior de energie prin deplasarea unui electron satelit pe o orbită mai îndepărtată de nucleul atomic.

Razele X sînt cele mai active, în special cele „moi", care au un intens efect bactericid. Dozele neletale opresc diviziunea şi produc modificări de ordin morfologic şi fiziologic.

Razele X „tari", ca şi razele α şi β, care sînt mai penetrante, deci mai puţin absorbite, au un efect antimicrobian mai slab.

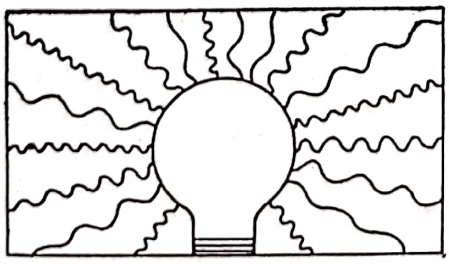
Radiaţiile β şi X sînt folosite în practică pentru sterilizarea conservelor alimentare, deşi dau alimentelor un miros particular, care poate fi numai parţial îndepărtat. De asemenea, ele sînt folosite pentru inactivarea vaccinurilor, avînd avantajul că nu modifică structura chimică şi antigenică a produsului tratat. Rezistenţa la iradiere este mult mai mare la microorganisme decît la mamifere. Astfel, în timp ce doza mortală pentru om este de aproximativ 500 *r*, pentru *E. coli* ea este de 10 000 *r*, pentru levuri 30 000 *r*, iar pentru *Paramoecium* 300 000 *r*. Recent s-au izolat bacterii viabile din apa de răcire a unei pile atomice care primise 100 milioane *r* în interval de 8 ore.

c. Acţiunea lasserului asupra microorganismelor

Laserul este un fascicul foarte concentrat şi puternic de cuante luminoase sau fotoni, generat de obicei în interiorul unui cristal de rubin (cristal de oxid de aluminiu în care sînt dispersaţi atomi de crom), ca urmare a „excitaţiei" atomilor de crom din cristal produsă prin modificarea stării lor energetice sub acţiunea luminii emise de o lampă cu xenon (blitzul fotografilor).

Denumirea de laser vine de la iniţialele cuvintelor engleze care îl definesc: *l*ight *a*mplification by *s*timulated *e*mission of *r*adiatio (amplificarea luminii prin emisie stimulată de radiaţii).

Spre deosebire de o sursă de lumină de tipul becului electric (cu lumină incandescentă), care emite lumină „incoerentă" sub formă de radiaţii „dispersate" şi de numeroase lungimi de undă diferite, laserul emite o lumină „coe-



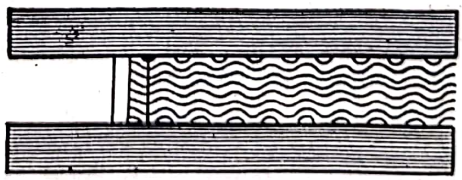


Fig. 200. Particularităţile radiaţiilor emise de o sursă de lumină incandescentă — bec electric — *(A)* comparativ cu acelea ale laserului *(B)*.

Scanned with OKEN Scanner

rentă", sub forma unui fascicul de radiaţii foarte apropiate între ele şi cu o lungime de undă practic uniformă cuprinsă între 3 000 şi 9 000 Å. Datorită proprietăţilor lui particulare, laserul poate acţiona extrem de intens şi foarte localizat, concentrînd o cantitate enormă de energie pe o suprafaţă infimă, strict circumscrisă. Aplicat asupra microorganismelor, el determină distrugerea lor instantanee şi ca atare poate fi folosit pentru sterilizarea unor medii care se degradează prin expunere la temperaturi ridicate.

d. Presiunea osmotică

În general, presiunea osmotică din interiorul celulelor bacteriene este ceva mai mare decît aceea a soluţiei reprezentate de un mediu de cultură uzual. Aceasta se datoreşte faptului că celula conţine în stare solvită concentraţii mai mari de substanţe minerale şi organice pe care le poate reţine graţie permeabilităţii selective a membranei ei citoplasmatice. Ca urmare, apa din mediu tinde să pătrundă în celulă pentru egalizarea concentraţiilor intra- şi extracelulare de substanţe solvite. De aceea, în condiţii normale celula bacteriană se află într-o stare de turgescenţă determinată de forţele de distensie intracelulare, caracteristice de altfel tuturor celulelor vii.

Dezvoltarea bacteriilor decurge în genere în condiţii optime atunci cînd mediul lor de viaţă are o presiune osmotică aproximativ echivalentă celei intracelulare, caracteristice de altfel tuturor celulelor vii.

Dezvoltarea bacteriilor decurge în genere în condiţii optime atunci cînd mediul lor de viaţă are o presiune osmotică aproximativ echivalentă celei intracelulare, reprezentînd deci pentru ele o soluţie izotonă.

Spre deosebire de celulele animale care, fiind lipsite de un perete celular rigid, sînt foarte sensibile la variaţiile osmotice (de exemplu, hematiile), bacteriile — protejate de un perete celular elastic dar suficient de rezistent — suportă relativ uşor modificările de presiune osmotice, dacă abaterile de la izotonie survin lent, treptat, permiţînd funcţiilor compensatoare de adaptare ale membranei citoplasmatice să intre în acţiune cu eficacitate. Dacă însă echilibrul izotonic se dereglează brusc, acţiunile brutale tinzînd la reechilibrarea osmotică determină lezarea mecanică a peretelui celular, ceea ce în aceste condiţii expune celula la degradări profunde cu efect letal.

Abaterile mari de la izotonie ale unui mediu de suspensie a bacteriilor generează două tipuri de modificări celulare caracteristice: *1) în medii hipertone* (de exemplu, în soluţii saline concentrate) bacteriile suferă fenomenul de *plasmoliză* în cursul căruia, datorită pierderii de apă — care trece în mediu — volumul celulei se micşorează, iar citoplasma se retractă sub forma unei mase sferice sau ovalare îndepărtate de peretele celular, care rămîne rigid şi devine uşor de pus în evidenţă chiar prin microscopie fotonică; *2) în medii hipotone* (de exemplu, în apă) se produce fenomenul de *plasmoptiză:* datorită pătrunderii de apă dinspre exterior, turgescenţa celulei creşte pînă cînd presiunea intracelulară, depăşind capacitatea de distensie a peretelui celular, determină dezagregarea unor structuri parietale însoţită de plesnirea peretelui şi extruzia

Scanned with OKEN Scanner

conținutului celular care se răspîndește în mediu.

Pentru a se dezvolta în condiții optime, microorganismele au, în general, nevoie ca în mediul de viață presiunea osmotică să fie mai curînd scăzută, puțin deosebită de cea intracelulară. O excepție o constituie microorganismele osmofile, care, dimpotrivă, se pot dezvolta numai în medii cu presiune osmotică ridicată. Ele sînt *halofile*, atunci cînd cresc în mod normal pe medii cu salinitate mare, sau *zaharofile*, cînd se dezvoltă în prezența unei concentrații mari (50—70%) de zahăr.

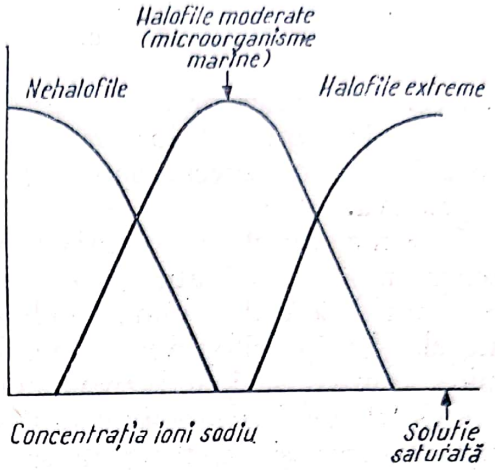


Fig. 201. Reprezentare diagramatică a curbelor de multiplicare a trei grupe de microorganisme (nehalofile, halofile moderate și halofile extreme) în funcție de concentrația ionilor de sodiu (după Brock).

Spre deosebire de marea majoritate a microorganismelor care sînt fie „sensibile" la sare, în sensul că nu o suportă la o concentrație mai mare de 2%, fie tolerante față de ea numai în anumite limite, microorganismele *halofile* se dezvoltă nestînjenit în condițiile unei salinități crescute. Halofilele *facultative*, capabile să se dezvolte în condițiile obișnuite de izotonie, pot crește bine și pe medii cu mai mult de 2% sare, în timp ce halofilele *obligate* din apa mării nu se dezvoltă decît în medii conținînd pînă la 15% NaCl, iar unele dintre ele, ca *Halobacterium salinarum* și *H. halobium* au nevoie de concentrații de sare care ating chiar 16—35% NaCl și 2% $MgSO_4$. Microorganismele halofile fac parte din flora normală a mărilor și oceanelor, a lacurilor sărate și a salinelor. Halofilii se găsesc, de asemeena, uneori, și în alimentele sărate (măsline, pește sărat, anchois), pe care nu totdeauna le alterează; ei au chiar o acțiune utilă, participînd la procesele de „maturare" a unor alimente ca unele brînzeturi, carne sărată etc.

În raport cu limitele relativ restrînse ale salinității care favorizează o dezvoltare microbiană optimă, gama concentrațiilor de sare față de care microorganismele sînt *tolerante* este mult mai largă. Ea merge de la nivelul salin infim din apa bidistilată (cu un conținut organic de numai 70μ g/l), în care este posibilă supraviețuirea unor bacterii heterotrofe și pînă la concentrația enormă de aproximativ 500 g sare/l la care pot crește unii fungi ca *Aspergillus oryzae* și *A. terricola*; unele bacterii halofile obligate — halofile extreme — care cresc în soluții saline suprasaturate, supraviețuiesc chiar pe cristalele de sare rămase după evaporarea unor bălți. Microorganismele osmofile au o deosebită importanță economică deoarece pot altera alimentele conservate în soluții concentrate de sare (saramuri) sau zahăr (siropuri), soluții care față de microorganismele comune exercită un efect microbiostatic.

Scanned with OKEN Scanner

e. Presiunea hidrostatică

Rezistenţa microorganismelor la acţiunea presiunilor înalte este variabilă în funcţie de habitatul lor natural şi este favorizată de capacitatea de sporogeneză a unor specii, sporul fiind de două ori mai rezistent decît forma vegetativă.

Cele mai sensibile în această privinţă sînt microorganismele solului, care în genere mor la 600 atm şi au o multiplicare mult încetinită la 300 atm. Presiunea ridicată determină modificări ale volumului celulei, ale vîscozităţii şi ale elasticităţii citoplasmei, imobilizarea cililor şi accelerarea unor reacţii chimice, urmate de inactivarea unor enzime şi încetarea diviziunii.

Celulele de *Escherichia coli* supuse la presiuni de 200—500 atm îşi încetinesc reproducerea şi au tendinţa să se transforme în filamente care depăşesc cu mult lungimea celulelor cultivate în condiţii normale (1 atm). Conţinutul în ARN creşte proporţional cu alungirea celulei, în timp ce cantitatea de ADN din celulele filamentoase rămîne aceeaşi ca şi în celulele normale. Z o B e l l consideră că presiunile înalte blochează replicarea ADN şi prin aceasta determină reprimarea diviziunii celulare, cu alungirea consecutivă în formă de filamente a celulei devenită incapabilă să se mai dividă. Presiunile mai ridicate (500—1 000 atm) accelerează viteza morţii celulelor de *E. coli* cultivate în bulion.

Bacteriile marine, b a r o f i l e, izolate de la mari adîncimi cu ajutorul sondelor, pot fi cultivate numai la presiuni hidrostatice comparabile celor din mediul lor natural. Astfel *B. submarinus* şi *B thalassokoïdes* izolate de la o adîncime de 10 462 m, unde presiunea apei este de aproximativ 1 000 atm, au fost cultivate la presiunea de 1 400 atm (Z o B e l l, 1956).

Microorganismele sînt foarte sensibile la modificări brusce alternative ale presiunii (de ordinul a 500—600 atm), produse prin aplicarea de presiune şi decompresiune, procedeu care poate fi folosit pentru distrugerea celulelor bacteriene.

f. Acţiunea ultrasunetelor

Dintre diferitele vibraţii mecanice, infrasunetele, care sînt neaudibile şi sunetele percepute de urechea umană (16—16 000 Hz) nu influenţează microorganismele. Vibraţiile ultrasonice şi cele supersonice produc moartea lor prin ruperea pereţilor celulari şi dezintegrarea structurilor intracelulare care se răspîndesc în mediu.

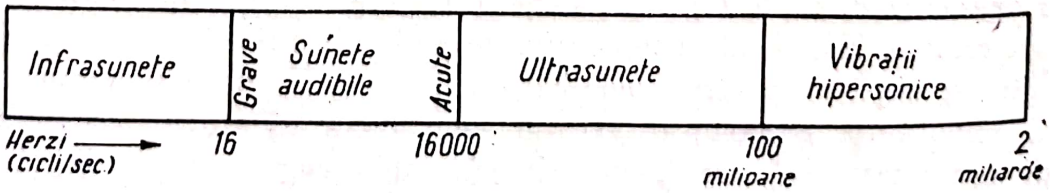


Fig. 202. Spectrul vibraţiilor sonice.

Eficienţa vibraţiilor sonice depinde mai mult de amplitudinea decît de frecvenţa lor. Ca atare, vibraţii cu frecvenţă relativ joasă dar cu intensitate mare sînt mai eficiente decît cele cu frecvenţă înaltă şi intensitate mică.

Sensibilitatea bacteriilor la ultrasunete variază cu specia şi, pe de altă parte, este mult mai mare pentru formele vegetative decît pentru spori.

Moartea şi liza bacteriilor se datoresc fenomenului de *cavitaţie*: pereţii celulari sînt intens bombardaţi de bule foarte mici de gaz, care se formează în lichidul de suspensie, ca rezultat al agitaţiei produsă de vibraţiile cu frecvenţă înaltă (ultrasonice şi hipersonice).

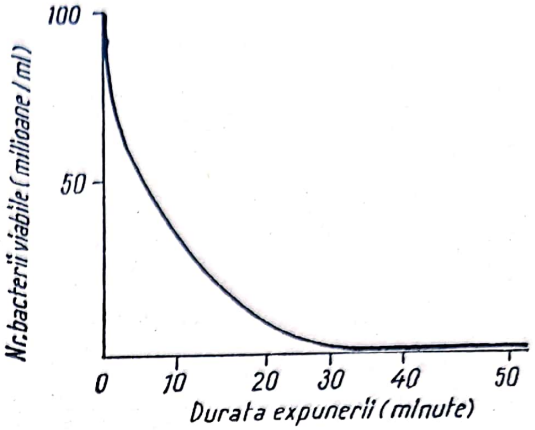


Fig. 203. Efectul letal al ultrasunetelor (750 000 cicli/sec.) în funcţie de durata expunerii, asupra bacteriei *Klebsiella pneumoniae* (după Hamre).

Acţiunea ultrasunetelor este folosită în practică pentru dezintegrarea celulelor bacteriene, separarea enzimelor sau altor constituenţi chimici sau antigenici, ca şi pentru sterilizarea anumitor produse.

2. ACŢIUNEA SUBSTANŢELOR CHIMICE ASUPRA MICROORGANISMELOR

Substanţele chimice din compoziţia unui mediu în care se dezvoltă microorganisme pot exercita, în funcţie de natura şi concentraţia lor, trei tipuri de efecte asupra acestora: favorizarea dezvoltării şi multiplicării celulare prin aportul de substanţe nutritive şi realizarea echilibrelor fizico-chimice indispensabile vieţii, blocarea potenţial-reversibilă a proceselor de multiplicare celulară, deci un *efect microbiostatic*, şi alterarea profundă şi ireversibilă a unor procese metabolice esenţiale, ceea ce reprezintă un *efect microbicid*.

Acţiunea substanţelor chimice asupra microorganismelor este însă diferită nu numai în raport cu natura şi concentraţia unei substanţe date, ci şi în funcţie de natura şi particularităţile fiziologice ale microorganismelor supuse acţiunii ei. Astfel, de exemplu, CO_2 şi H_2S sînt toxice pentru majoritatea microorganismelor aerobe al căror metabolism respirator îl inhibă, în timp ce pentru unele specii bacteriene ele constituie o sursă de energie. În plus, una şi aceeaşi substanţă chimică poate acţiona în moduri diametral opuse în funcţie de concentraţia ei: în concentraţie mică (1%) zaharoza este o sursă bună de C şi energie, în timp ce în concentraţii mari (40%) se comportă ca un agent bacteriostatic.

Substanţele folosite în metabolismul microbian au rolul de surse de C, de N şi de energie sau acţionează ca factori de creştere. În general, urmărindu-se dinamica dezvoltării unei populaţii bacteriene sub influenţa concentraţiei unei anumite substanţe nutritive în mediu, se observă că la concentraţii foarte mici ale acesteia creşterea bacteriană este foarte slabă şi că ea se intensifică pro-

Scanned with OKEN Scanner

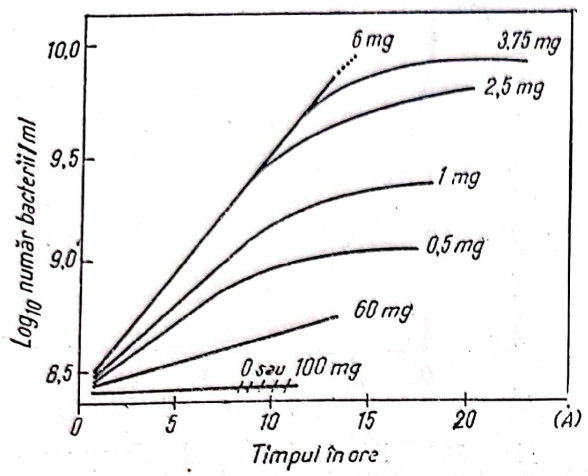


Fig. 204. Influenţa concentraţiei substanţelor nutritive în mediu asupra creşterii bacteriilor. Graficul redă curba de creştere a unei tulpini de *Pseudomonas* sp. în medii cu concentraţii variabile de fructoză (mg/ml mediu) ca unică sursă de C, ceilalţi factori din mediu fiind invariabili.

porţional cu creşterea concentraţiei substanţei nutritive, dar numai pînă cînd aceasta atinge un nivel determinat, după care ritmul de creştere a populaţiei celulare devine constant, independent de mărirea mai departe a concentraţiei substanţei respective; cînd această mărire ajunge la limita tolerabilă pentru celulă, se produce inhibiţia creşterii microbiene, iar dincolo de această limită substanţa nutritivă poate avea chiar un efect microbicid.

Unele substanţe pot determina fenomene de *chimiotaxie* sau chimiotropism, prin care microorganismele sînt atrase de o anumită substanţă (chimiotactism pozitiv) sau, dimpotrivă, se îndepărtează ori sînt inhibate de ea în activitatea lor (chimiotactism negativ).

Efectele dăunătoare ale unor compuşi chimici pot fi de tip microbiostatic, determinînd inhibiţia procesului de multiplicare, sau de tip microbicid, antrenînd moartea celulelor expuse. Unele substanţe chimice au asemenea efecte chiar la doze mici şi foarte mici, ceea ce permite folosirea lor avantajoasă în practică. Împărţirea substanţelor chimice în bacteriostatice şi bactericide este însă destul de arbitrară, astfel că ea este admisă doar în mod convenţional, deoarece o substanţă care este bacteriostatică în concentraţie mică sau cînd acţiunea ei este de scurtă durată poate fi bactericidă la concentraţii mari sau după o acţiune prelungită. Cu toate acestea, caracterizarea corectă a unei substanţe ca bacteriostatică sau bactericidă devine posibilă dacă se ţine seama de următoarele trei criterii: *1*) concentraţia la care se manifestă un anumit efect; după o acţiune prelungită. Cu toate acestea, caracterizarea corectă a unei substanţei şi viteza ei de acţiune. În mod general, se poate spune că o substanţă chimică este *în special microbicidă* (bactericidă sau fungicidă) dacă efectul ei microbicid se produce cu o viteză foarte mare şi se manifestă chiar la concentraţii foarte mici şi este *în special microbiostatică* (bacteriostatică sau fungistatică) dacă efectul ei microbiostatic rămîne ca atare şi la concentraţii relativ mari de substanţă activă, iar viteza de omorîre a celulelor este foarte mică, astfel încît cel puţin unele celule pot supravieţui timp foarte îndelungat. În practică, în afară de termenii „bactericid" şi „bacteriostatic", care au o semnificaţie strictă pentru substanţele cu acţiune antimicrobiană, se folosesc şi alte denumiri, ca acelea de *antiseptice* şi *dezinfectante*. Antisepticele sînt substanţe chimice care, aplicate pe ţesuturile vii, împiedică activitatea şi multiplicarea microorganismelor existente pe ele (efect microbiostatic), iar dezinfectantele sînt substanţe care se aplică în mod obişnuit pe obiectele neanimate

în scopul omorîrii microorganismelor contaminante (efect microbicid).

Mecanismul de acțiune al substanțelor antimicrobiene. Efectele nocive ale unor substanțe chimice asupra microorganismelor se pot exercita pe mai multe căi: *1*) modificări de permeabilitate la nivelul peretelui celular și al membranei citoplasmatice; *2*) denaturarea unor constituenți celulari esențiali cum sînt proteinele; *3*) blocarea grupărilor funcționale active ale enzimelor și interferența cu metabolismul producător de energie; *4*) inhibarea competitivă — prin analogie sterică — a reacțiilor de biosinteză etc.

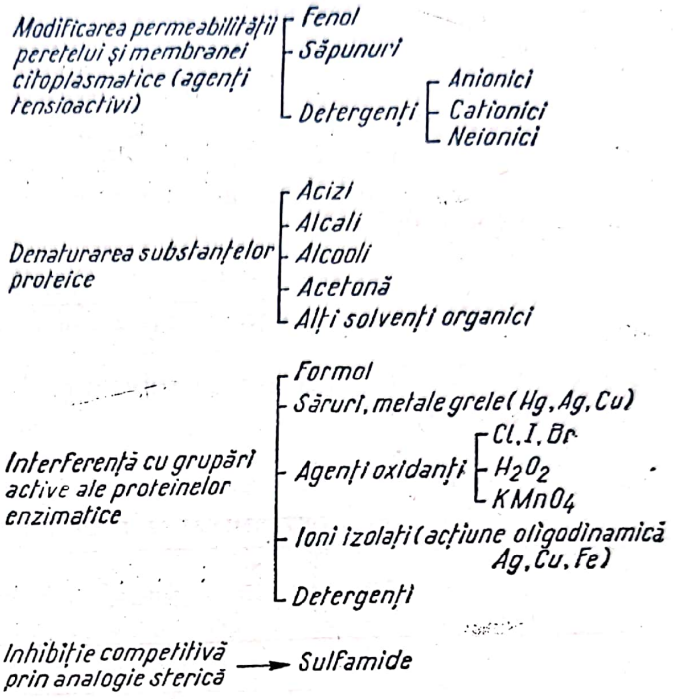


Fig. 205. Clasificarea principalelor substanțe chimice cu acțiune antimicrobiană după modul lor principal de acțiune.

În unele cazuri aceeași substanță își poate exercita acțiunea pe două sau mai multe căi concomitent, dar în mod obișnuit una dintre acestea reprezintă calea principală de acțiune.

a. Substanțe antimicrobiene acționînd prin modificări de permeabilitate

Substanțele din această categorie (fenolul, săpunurile și detergenții) produc modificări fizico-chimice care duc la pierderea permeabilității selective a membranelor celulare, ceea ce are ca urmare incapacitatea membranei citoplasmatice de a reține în celulă substanțele utile (aminoacizi, nucleotide, coenzime și ioni minerali) și de a opri pătrunderea din exterior a unor substanțe nocive.

— *Fenolul* (*acid carbolic* — C_6H_5OH), primul dezinfectant cunoscut, acționează inițial asupra membranelor celulare, după care produce denaturarea proteinelor. Utilizarea lui este limitată de faptul că este iritant și produce coagularea proteinei din țesuturi. În diluția de 5‰ este folosit ca prezervant pentru diferite preparate biologice. Prin convenție internațională activitatea fenolului este considerată ca un etalon în raport cu care se apreciază activitatea antimicrobiană a diferitelor substanțe.

Coeficientul fenolic (*CF*), propus de Rideal și Walker (1903) este un indice care exprimă puterea microbicidă a unei substanțe, comparativ cu aceea a fenolului asupra a două microorganisme test (*Salmonella typhi* și

Staphylococcus aureus, tulpina *Oxford*) supuse unui contact de 10 minute în condiţii standardizate de compoziţie chimică şi reacţie a mediului, vîrstă a culturii, temperatură de incubare, raport cantitativ dezinfectant/cultură etc.

CF se calculează determinînd mai întîi cele mai mici concentraţii active de fenol (de exemplu, 1 : 100) şi din substanţa de cercetat (de exemplu, 1 : 5 000) şi raportînd după aceea puterea microbicidă a substanţei necunoscute la aceea a fenolului:

$$CF = \frac{\text{conc. minimă activă substanţă X}}{\text{conc. minimă activă fenol}} = \frac{5\,000}{100} = 50$$

Coeficientul fenolic 50 arată că substanţa X este de 50 de ori mai activă decît fenolul (tab. 14).

TABELUL 14

DETERMINAREA COEFICIENTULUI FENOLIC

	Diluţia	Durata contactului cu dezinfectantul, în minute		
		5′	10′	15′
Fenol	1 : 90	0	0	0
	1 : 100	+	0	0
	1 : 110	+	+	0
Substanţa de cercetat	1 : 4 000	0	0	0
	1 : 5 000	+	0	0
	1 : 6 000	+	+	+

0 — absenţa dezvoltării culturii.
+ — dezvoltarea culturii.

— *Săpunurile* îşi datoresc efectul antimicrobian acţiunii acizilor graşi nesaturaţi (oleic, linoleic şi linolenic) din compoziţia lor. Această acţiune, manifestată numai faţă de unele bacterii, se exercită asupra constituenţilor lipidici şi membranelor celulare, care devin astfel mai permeabile pentru substanţele germicide din soluţia de săpun. Pe de altă parte, datorită capacităţii lor de a emulsiona substanţele grase în care sînt încorporate bacteriile de pe tegumente, săpunurile determină o reducere masivă a numărului acestor microorganisme şi prin uşurarea îndepărtării lor mecanice prin spălare.

— *Detergenţii* sînt substanţe tensioactive obţinute pe cale de sinteză chimică, pornind de la materii prime de natură petrolieră. Deşi molecula lor este similară aceleia a săpunurilor, detergenţii sînt înzestraţi cu proprietăţi fizice şi chimice care îi fac mult superiori ca eficacitate. Ei sînt complexe organice cu moleculă amfipatică, a cărei activitate de suprafaţă are ca efect „udarea" sau „muierea" (graţie funcţiei lor de „muianţi), desorbţia, emulsionarea, suspendarea şi stabilizarea particulelor dislocate de pe o suprafaţă. Rezultatul însumării acestor efecte succesive este detergenţa sau curăţirea.

Scanned with OKEN Scanner

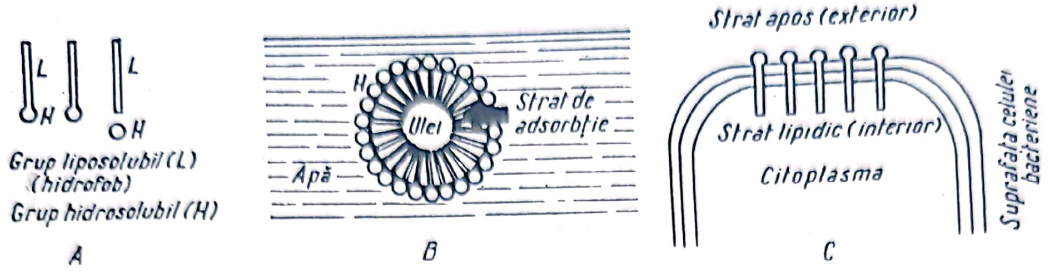


Fig. 206. Modul de acțiune al substanțelor detergente:
A — molecula asimetrică a unui detergent; *B* — orientarea moleculelor de detergent la interfața a două lichide insolubile (apă și ulei) cu formarea stratului de adsorbție care face legătura între ele; *C* — orientarea moleculelor de detergent la interfața dintre membranele celulei bacteriene, care conțin lipide și mediul apos înconjurător.

Molecula agenților tensioactivi are o structură asimetrică, fiind compusă din două părți cu proprietăți fundamental diferite: o parte (grupare) hidrofobă — deci lipofilă sau liposolubilă — și o grupare polară hidrofilă, deci hidrosolubilă. Datorită acestei structuri asimetrice, atunci cînd un agent tensioactiv aflat în soluție apoasă vine în contact cu o suprafață lipidică, moleculele lui se orientează în așa fel încît grupările lor hidrofobe se adsorb pe această suprafață (care poate fi și interfața a două lichide insolubile, cum ar fi, de exemplu, apa și uleiul), iar cele hidrofile polare rămîn mai departe în apă. Moleculele astfel orientate formează un strat de adsorbție care face legătura între cele două medii insolubile: lipide și apă, ceea ce determină efectul de „muiere" sau „udare", ca rezultat al scăderii tensiunii superficiale. Celulele bacteriene acoperite cu moleculele unor detergenți au pe suprafața lor un număr mărit de sarcini negative și ca atare se resping, ceea ce asigură dispersia lor în lichid și expunerea lor mai eficace la acțiuni antibacteriene. Datorită aceloraşi particularități de acțiune, pe lîngă efectele de muiere, emulsionare și antrenare a particulelor, substanțele din această categorie care pot pătrunde în celule străbat învelișurile celulare bogate în lipide, exercitînd și un efect microbicid direct.

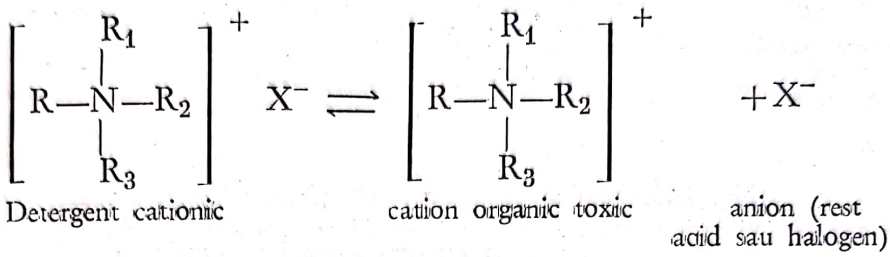
După natura lor chimică detergenții sînt de trei tipuri: cationici, anionici și neionici.

Detergenții anionici (de tip „Alba", „Perlan" etc.) sînt săruri de Na și K ale acizilor grași superiori. Ei au o acțiune antimicrobiană foarte slabă, datorită faptului că eliberează prin disociere un anion organic cu toxicitate redusă. Această acțiune este mai puternică la un *p*H scăzut și se manifestă mai eficace asupra bacteriilor Gram-pozitive.

Detergenții cationici (de tip „Cetavlon", „Cetazol", „Bromocet") sînt săruri de amoniu cuaternar, care prin disociere liberează un cation organic toxic. Bacteriile care vin în contact cu un detergent cationic își pierd sarcina electronegativă prin adsorbție de ioni pozitivi, ceea ce determină alterarea peretelui celular și a membranei citoplasmatice, cu pierderea rigidității, a elasticității și a semipermeabilității parietale. Ca urmare, numeroși constituenți citoplasmici importanți conținînd N și P părăsesc celula, în timp ce substanța activă pătrunde în interiorul ei unde denaturează proteinele.

Scanned with OKEN Scanner

Bromocet („Cetazol" sau D-catiol-bromura de cetilpiridin) este activ în concentraţiile 1/4 000 (bactericid) şi 1 : 20 000 (bacteriostatic). Este folosit în practică în soluţie apoasă 1—2‰.



Detergenţii neionici (polieteri şi esteri poliglicerici) sînt complet lipsiţi de acţiune antimicrobiană. Unii dintre ei („Tween" 80) sînt folosiţi ca dispersanţi ai celulelor bacteriene, pentru a favoriza creşterea şi multiplicarea lor.

b. Substanţe antimicrobiene acţionînd prin denaturarea proteinelor

Substanţele chimice care denaturează proteinele produc modificări fizico-chimice ale coloizilor citoplasmatici, determinînd suprimarea activităţii enzimelor şi chiar precipitarea sau coagularea proteinelor celulare.

— *Acizii* şi *alcalii*. Dezvoltarea microorganismelor depinde, printre altele, de anumite limite de *p*H (minim, optim şi maxim), care corespund în mare măsură condiţiilor caracteristice ale habitatului şi modului lor de viaţă natural. Astfel, microorganismele capabile să ajungă în intestin fără a fi afectate de aciditatea gastrică (*p*H 1,6—2,0) şi de acţiunea bilei (*p*H 6,6—7,6) tolerează diferenţe mai mari de *p*H decît microorganismele care invadează sîngele şi ţesuturile unde *p*H-ul este mai constant şi apropiat de neutralitate (*p*H 7,3). Cele mai multe bacterii pot fi cultivate în medii a căror reacţie este cuprinsă între *p*H 6 şi *p*H 9, diferenţa de concentraţie a ionilor de H fiind în acest caz echivalente cu diferenţa de la 1 la 1 000. Această largă toleranţă faţă de valoarea *p*H se datoreşte faptului că bacteriile vii sînt relativ puţin permeabile faţă de ionii de H^+ şi OH^-, ceea ce le permite menţinerea neutralităţii interne. Aşa se explică de ce deseori tocmai acizii slabi şi bazele slabe, care se disociază puţin, au un efect antimicrobian evident; acest efect nu este direct legat de concentraţia ionilor de H^+ şi OH^-, ci de prezenţa a numeroase molecule nedisociate, acide sau bazice, care pot pătrunde în celulă mult mai uşor decît ionii corespunzători. Aceasta explică, de asemenea, de ce într-un mediu uşor acid, acidul acetic este toxic pentru bacterii, pe cînd HCl nu are decît un efect antimicrobian slab. Într-adevăr, la un *p*H relativ scăzut al mediului, acizii slabi aflaţi în mare măsură sub formă nedisociată pot pătrunde în celula bacteriană modificîndu-i *p*H-ul interior, în timp ce acizii tari, intens disociaţi, rămîn practic în afara ei. Dacă însă mediul este neutru sau alcalin, moleculele de acid acetic sînt aproape complet ionizate, ceea ce le îngreuiază accesul în celulă şi, ca urmare, toxicitatea lor este anihilată. Acest mod de

Scanned with OKEN Scanner

comportare este caracteristic şi bazelor slabe: NH_3 este toxic în mediu slab alcalin şi inofensiv pentru bacterii în mediu neutru sau acid. Acţiunea antimicrobiană a acizilor organici slabi se datoreşte nu numai capacităţii moleculelor neionizate de a depăşi bariera de permeabilitate reprezentată de peretele celular şi de membrana citoplasmatică, ci şi unor factori ca toxicitatea moleculelor nedisociate şi afinitatea specifică a anionului pentru proteinele celulare.

Pentru acizii tari, ca şi pentru bazele tari, eficienţa acţiunii antimicrobiene este proporţională cu concentraţia de H^+, respectiv a OH^-, în soluţie. O dovadă în acest sens o constituie faptul că HCl 0,0077 N şi H_2SO_4 0,0096 N reduc în aceeaşi proporţie (cu 90%) o populaţie de *E. coli* în 40 minute deoarece, dat fiind că HCl se disociază mai intens decît H_2SO_4 concentraţia finală a H^+ este practic egală în cele două soluţii de normalitate diferită.

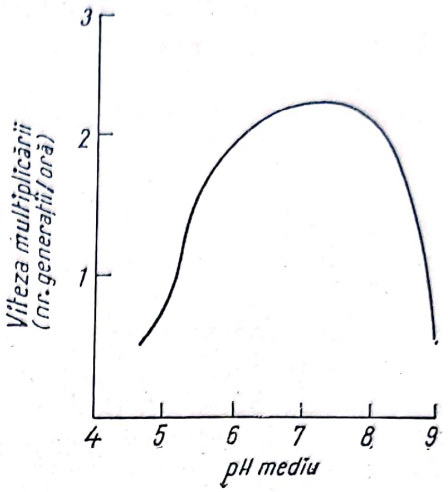


Fig. 207. Influenţa modificărilor de *p*H asupra vitezei de multiplicare (exprimată în numărul de generaţii pe oră) la *E. coli* (după Gale).

TABELUL 15

LIMITELE DE *p*H CARE PERMIT DEZVOLTAREA UNOR MICROORGANISME

	*p*H			Habitat
	minimum	optimum	maximum	
Thiobacillus thiooxidans	0	2	6	Roci sulfuroase şi fosfatice. Soluri cu compuşi oxidaţi ai sulfului
Bacillus subtilis	4,5	6,0—9,2	8,5	Sol, substanţe organice în curs de descompunere
Nitrobacter sp.	5,7	8,4—9,2	10,2	Sol
Rhizobium leguminosarum	3,2—5,0	7,2	10—11	Sol, nodozităţi plante leguminoase
Beijerinkia indica	4	5,5—6	9,5	Soluri acide
Neisseria meningitidis	6,1	7,4	7,8	Căile respiratorii la om
Diplococcus pneumoniae	7,0	7,8	8,3	Căile respiratorii la om
Escherichia coli	4,3	6,0—8	6,5	Intestin om şi animale
Levuri	2,5	4,0—5,8	8,0	Sol
Mucegaiuri	1,5	3,8—6	7—11	Sol, substanţe organice în curs de degradare

Scanned with OKEN Scanner

Unele bacterii sînt acidofile sau chiar acidotolerante: *Lactobacillus* sp. se dezvoltă la un *p*H=4, iar *Thiobacillus thiooxidans* chiar în prezenţa H_2SO_4 0,1 M (sub *p*H 0). Acţiunea antimicrobiană a acizilor este folosită în practică pentru conservarea alimentelor cu acid acetic 5% sau prin fermentaţie lactică naturală (tab. 15).

— *Alcoolii.* Acţiunea germicidă a diferiţilor alcooli creşte în raport cu greutatea lor moleculară de la metanol (cel mai puţin activ) la etanol, propanol, butanol (cel mai activ). Alcoolul propilic în concentraţie de 80% este un dezinfectant foarte bun, fiind în acelaşi timp un bun solvent al grăsimilor şi nefiind foarte volatil. Alcoolul etilic absolut (100%), ca şi cel comercial (96°), sînt ineficienţi ca agenţi antimicrobieni (*CF*=0,04). Mai activ este alcoolul de 50—70°, deşi unele bacterii pot supravieţui destul de mult în prezenţa lui (*B. anthracis* peste 1 200 de ore, stafilococul 1 oră, *Myc. tuberculosis* 2—10 minute).

c. Substanţe antimicrobiene acţionînd prin interferenţă cu grupările active ale proteinelor-enzime

Unele substanţe au proprietatea de a afecta activităţile vitale ale microorganismelor, prin aceea că acţionează direct asupra unor grupări reactive (amino, carboxil, fenol, sulfhidril, amido, indol etc.) din structura enzimelor, combinîndu-se cu ele şi blocînd în felul acesta sau modificînd activitatea enzimatică. În funcţie de soliditatea legăturii formate între aceste substanţe şi grupările reactive ale enzimelor microbiene, efectul este microbiostatic sau microbicid, iar reacţia este reversibilă sau ireversibilă.

— *Formaldehida* reacţionează cu grupări ca —NH_2 şi —OH, foarte numeroase în structura enzimelor, înlocuind cîte un H din două grupări de acest tip de pe molecule diferite de proteină, pentru a forma aşa-numitele punţi metilenice (R—CH_2—R), care leagă ireversibil moleculele proteice şi, în felul acesta, le inactivează. Formaldehida este folosită în soluţie apoasă (formalină sau formol comercial, conc. 37%) (*CF*=1) sau prin vaporizare la cald. În concentraţie de 4‰ ea este folosită ca prezervant pentru vaccinuri şi preparate microbiene de diagnostic.

— *Sărurile metalelor grele* (Hg, Ag, Cu) au o acţiune antimicrobiană destul de puternică. Cele mai active sînt sărurile de mercur, sub formă anorganică ($HgCl_2$ sau sublimatul corosiv, cu *CF*=827, şi oxicianura de Hg) sau sub formă organică (mertiolat de Na). Acţiunea sărurilor de mercur se datoreşte formării de mercaptide cu grupările sulfhidrilice (—SH) ale proteinelor. Reacţia dintre toxic şi proteina bacteriană este iniţial reversibilă şi se manifestă, după un contact scurt sau cu o cantitate mică de substanţă, prin pierderea capacităţii de multiplicare. Microorganismele aparent omorîte pot fi „reînviate" dacă efectul toxicului este neutralizat prin adăugarea de grupări —SH în exces, sub formă de glutation sau tioglicolat. După un contact prelungit sau cu concentraţii mai mari de Hg, reacţia devine ireversibilă, ceea ce determină moartea bacteriilor. $HgCl_2$ este folosit curent în laborator în concen-

Scanned with OKEN Scanner

trații de 1 : 1 000—5 : 1 000, care omoară toate microorganismele. La diluțiile 1 : 20 000—1 : 100 000, $HgCl_2$ are efect bacteriostatic.

— *Agenții oxidanți* (halogenii, permanganatul de K, peroxizii). Dintre halogeni, toxicitatea maximă o are Cl, urmat în ordine de I, Br, F.

Clorul (CF=200) este un bactericid foarte puternic. Adăugat în apă (apa de clor) formează *acid hipocloros* — produs instabil care degajă O_2 în stare născîndă — un oxidant foarte energic, după reacțiile: $Cl_2+H_2O \rightleftharpoons HCl+$ $+HClO$; $2\,HClO \rightleftharpoons 2\,HCl+O_2$. În soluție apoasă (apa de clor) este bactericid în concentrație de 0,02%, după maximum 5 minute. Se folosește curent pentru tratarea apei potabile (clorinare), utilizîndu-se 1—3 mg Cl.

Cloraminele sînt derivați cloruraţi ai aminelor (cu formula generală R—NHCl), care au avantajul de a fi mult mai stabili decît hipocloriții. Sînt substanțe cristaline solubile în apă, cu care dau prin hidroliză *hipoclorit de Na*, respectiv anion hipocloros. Sînt active în concentrații de 0,5—1,5%, exprimate în clor activ.

Permanganatul de K ($KMnO_4$), folosit în medicină în concentrație de 1 : 1 000 este un antiseptic puternic, avînd însă dezavantajul că activitatea sa este neutralizată de prezența substanțelor organice.

Peroxidul de H sau *perhidrolul* (H_2O_2 în soluție 30%) este folosit ca apă oxigenată (soluție comercială de perhidrol 3%). Este un agent oxidant care se descompune ușor în H_2O și O liber și de aceea are activitate bactericidă foarte slabă *in vitro* (*CF*=0,01). În condiții care previn descompunerea lui rapidă, ca și *in vivo* — unde activitatea sa pare să fie potențată de urme de Cu și Fe — activitatea sa pare să fie mai mare. Este inactivat de prezența catalazei.

— *Ionii izolați ai unor metale* (Ag, Cu, Fe) au pentru microorganisme o toxicitate determinată de acțiunea lor oligodinamică, în sensul că este legată de prezența unor concentrații extrem de mici ale ionilor respectivi. Ionii Ag au efect microbiostatic în concentrație de 0,01γ/l și microbicid la 50γ/l. Această acțiune s-ar explica prin afinitatea foarte mare pentru ionii Ag a unor proteine celulare care i-ar fixa masiv chiar din soluții extrem de diluate. Clark a demonstrat că bacteriile omorîte sub acțunea ionilor de Ag, conțin în medie 10^6 ioni/celulă, ceea ce corespunde aproximativ numărului de molecule de enzime proteice dintr-o celulă.

Dinamica procesului de dezinfecție și factorii care îl influențează. Acțiunea substanțelor dezinfectante asupra microorganismelor se desfășoară ca un proces

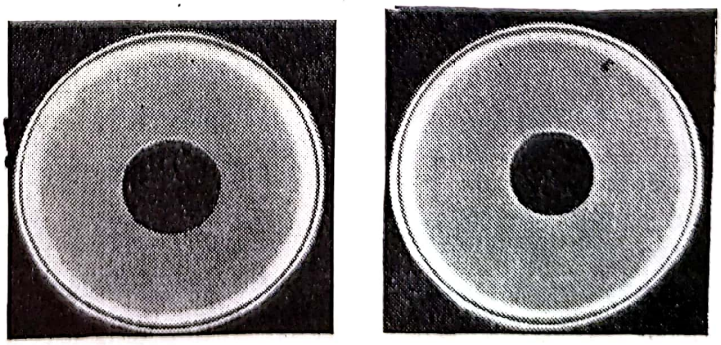


Fig. 208. Acțiunea oligodinamică a argintului față de *Sarcina lutea* (*A*) și *Serratia marcescens* (*B*) evidențiată prin depunerea unei monede de argint pe suprafața mediului. Zonei de inhibiție din jurul monedei îi urmează o zonă în care creșterea este stimulată, iar în rest cultura este normală.

Scanned with OKEN Scanner

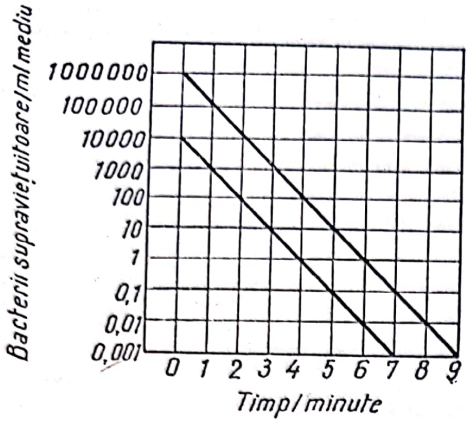


Fig. 209. Acțiunea dezinfectantelor asupra microorganismelor. Graficul redă numărul bacteriilor supraviețuitoare pe 1 ml mediu în raport cu timpul, în condiții care determină moartea a 90% din celule în fiecare minut.

treptat, în cursul căruia numărul bacteriilor viabile scade progresiv. Ca urmare, în fiecare unitate de timp vor fi distruși un procent egal de supraviețuitori, astfel că timpul necesar pentru o sterilizare completă variază în funcție de numărul inițial al microorganismelor. Acțiunea antimicrobiană mai este influențată de factori biologici ca specia, faza de creștere, prezența sau absența sporilor, precum și de factori de mediu ca natura și concentrația substanței bactericide, durata acțiunii ei, compoziția chimică, temperatura și *p*H-ul mediului. În general, prezența în mediu a unor substanțe organice supraadăugate, alcalinitatea și temperaturile scăzute diminuă efectele toxicelor chimice.

d. Substanțe antimicrobiene active prin inhibiție competitivă

Acțiunea antimicrobiană a unor substanțe se bazează pe asemănarea dintre molecula lor și aceea a unui metabolit microbian esențial căruia, din cauza acestei asemănări structurale, i se poate substitui, ceea ce blochează procesul de biosinteză în care este implicat acest metabolit.

Sulfamidele reprezintă un grup de substanțe microbiostatice avînd ca prototip *sulfanilamida (paraaminobenzensulfonamida)*. Celelalte sulfamide derivă de la acest prototip prin substituirea cu diverși radicali a unuia sau a doi atomi de H de la N aminic (C_1) sau amidic (C_4). Pe lîngă produsele astfel obținute, se mai folosesc „sulfamidele" care conțin numai gruparea SO_2 (sulfonă) sau SO (sulfoxid) ca și „sulfamide" fără sulf. Cu toate că în asemenea cazuri denumirea de sulfamidă nu corespunde realității, ea s-a păstrat în practică, fiind intrată în limbajul curent. Mecanismul acțiunii sulfamidelor a fost lămurit cînd W o o d s a demonstrat că *acidul paraaminobenzoic* (APAB) are o acțiune antagonistă netă față de aceste substanțe, în sensul că anihilează efectul lor antimicrobian. Acțiunea antagonistă nu este însă directă, ci se exercită numai prin intermediul metabolismului bacterian. APAB (vitamina *H*) reprezintă un metabolit esențial pentru bacterii, deoarece intră în structura unui factor de creștere important, *acidul folic*. Ținînd seama de marea asemănare de structură chimică — adică de analogia sterică — dintre cele două substanțe (sulfamidă și APAB), s-a emis ipoteza, verificată ulterior pe cale experimentală, că între ele s-ar produce un fenomen de concurență sau de competiție. Sulfamida se comportă ca o *antivitamină* sau un *antifactor*, substituindu-se factorului metabolic APAB în reacțiile la care acesta participă, ceea ce are ca urmare blocarea reacțiilor respective. În felul acesta, bacteria este lipsită de o cale metabolică esențială, întrucît APAB izolat, neintegrat în structura aci-

Scanned with OKEN Scanner

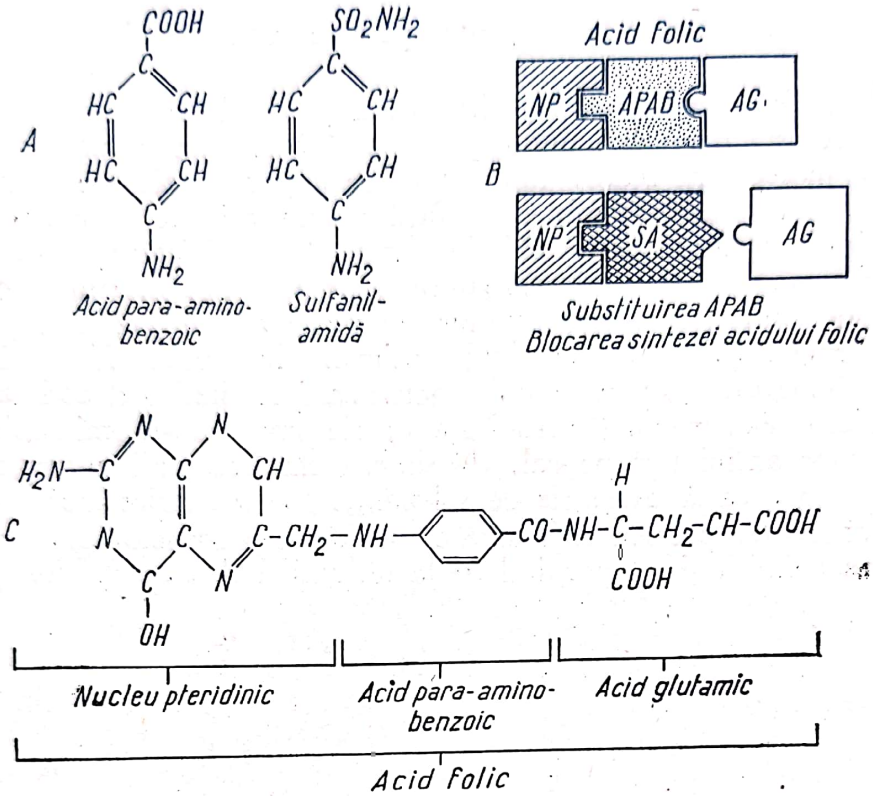


Fig. 210. Reprezentare schematică a mecanismului de acţiune a sulfamidelor: dacă sulfamida (SA) se găseşte în cantitite suficientă, ea se substituie (*B*) acidului paraaminobenzoic (APAB) şi în felul acesta, împiedică formarea acidului folic (*C*), factor de creştere esenţial pentru numeroase microorganisme.

dului folic, este inactiv. Inhibiţia competitivă este favorizată de faptul că sulfamidele au în general o mare capacitate de a se substitui APAB. Pornind de la ideea că în trăsăturile sale fundamentale metabolismul este acelaşi la toate bacteriile, rezultă că practic toate speciile utilizează acidul folic, chiar dacă nu toate îl pot sintetiza. Pentru bacteriile capabile să sintetizeze singure acidul folic (şi uneori şi APAB), pornind de la molecule mai simple, sulfamidele sînt toxice, deoarece interferă cu biosinteza acidului folic, determinînd prin substituirea APAB formarea de analogi nefuncţionali ai acidului dihidropteroic. Dacă însă bacteriile sînt incapabile să sintetizeze acidul folic, astfel că acest factor de creştere trebuie să le fie furnizat ca atare, preformat în mediul de cultură, ele nu au cum să fie afectate de prezenţa sulfamidelor întrucît nu există calea metabolică de sinteză a acidului folic — cu care o sulfamidă să interfere prin substituirea APAB. În mod similar, organismele animale, incapabile să sintetizeze acidul folic de care dispun totdeauna din sursă exogenă, nu sînt influenţate de sulfamide.

Efectul sulfamidelor este în special bacteriostatic. Celulele private de metabolitul esenţial prezintă alterări metabolice şi structurale şi, în cele din urmă, cad mai uşor pradă mijloacelor de apărare ale organismului-gazdă şi, în special, acţiunii fagocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

e. Substanţele chimioterapeutice antimicrobiene

Sulfamidele fac parte din categoria substanţelor chimioterapeutice antimicrobiene. Sub această denumire sînt cuprinse astăzi un număr mare de substanţe cu greutate moleculară relativ mică, a căror acţiune toxică se exercită direct şi selectiv asupra microorganismelor, fără a leza celulele organismului-gazdă. Deşi principiul fundamental al chimioterapiei este toxicitatea selectivă a agenţilor chimioterapici pentru microorganismul parazit, dependenţa efectului antimicrobian de caracterul interacţiunilor complexe dintre gazdă şi parazit este certă. Ca urmare, eficacitatea acţiunii antimicrobiene poate fi diferită *in vivo* şi *in vitro*. Substanţele chimioterapice acţionează fie inhibînd activitatea metabolică a microorganismelor (microbiostatic), fie omorîndu-le (microbicid). După obţinerea unor antibiotice pe cale de sinteză chimică, unii autori introduc şi antibioticele în această categorie de substanţe. În sens strict însă, termenul de substanţă chimioterapeutică trebuie rezervat numai produselor obţinute exclusiv prin sinteza chimică şi nu pornind de la un model de natură biologică.

Scanned with OKEN Scanner

APARIŢIA ŞI EVOLUŢIA BACTERIILOR PE PĂMÎNT

1. APARIŢIA BACTERIILOR PE PĂMÎNT

Apariţia primelor sisteme celulare, deci evoluţia biologică, s-a produs acum aproximativ 2,5 miliarde de ani, adică după circa 500 milioane ani de la formarea crustei solide a planetei.

Bacteriile sînt considerate de foarte mulţi cercetători drept forme primordiale de viaţă pe Pămînt, din cauza dimensiunilor lor mici, a simplicităţii morfologice şi structurale, a particularităţilor metabolismului lor, precum şi a faptului că, astăzi încă, ele reprezintă cele mai simple celule care trăiesc liber în mediu. De altfel, însăşi denumirea de *germeni,* cu care ele sînt desemnate în limbajul curent (derivă din latinul *germes* sau *germinis* — entitate din care se naşte ceva care creşte) sugerează caracterul de organisme originare care li se atribuie. Pe de altă parte, vechimea diferită a fosilelor reprezentînd diverse grupe sistematice, determinată cu ajutorul măsurătorilor radiochimice, demonstrează existenţa unei ordini determinate în succesiunea lor istorică, de exemplu, în cazul vertebratelor (*peşti → amfibieni → reptile → mamifere; reptile → păsări*), ceea ce sugerează realitatea unei adevărate filiaţii evolutive în apariţia organismelor vii. Acest fapt, ca şi găsirea probei istorice directe, fosilele bacteriene din rocile sedimentare, dovedind existenţa bacteriilor încă din Precambrian, pledează pentru ideea că aceste microorganisme, cu structura lor celulară mult mai simplă decît aceea a plantelor şi a animalelor, pot fi privite ca un grup de linii evolutive izolate, care din momentul diferenţierii lor survenite probabil într-un stadiu foarte precoce al evoluţiei vieţuitoarelor, au supravieţuit ca atare, fără mari modificări şi fără noi diferenţieri esenţiale.

Iniţial, s-a considerat că bacteriile, ca şi celelalte organisme vii, ar fi apărut spontan din materia lipsită de viaţă prin aşa-zisa *generaţie spontană.* Această teorie a fost combătută de L. Spallanzani (1729—1799), dar mai ales de Pasteur, care a demonstrat în mod indiscutabil imposibilitatea generaţiei spontane. O altă concepţie, derivată din teoria *panspermiei,* conform căreia viaţa ar fi fost adusă pe Pămînt de pe alte planete, admitea că bacteriile autotrofe ar fi fost primii germeni de viaţă pe Pămînt, însămînţaţi prin intermediul prafului cosmic şi al meteoriţilor. Obiecţia cea mai importantă împotriva acestei ipoteze este aceea că, neprotejate, bacteriile nu pot străbate distanţele enorme din Univers, datorită faptului că ele nu rezistă nici măcar un timp scurt la radiaţiile cosmice care distrug rapid orice urmă de viaţă.

Scanned with OKEN Scanner

Teoriile cele mai larg acceptate în ceea ce privește originea bacteriilor sînt acelea conform cărora aceste microorganisme au apărut în mod indubitabil pe planeta noastră. Ceea ce este încă discutabil în legătură cu condițiile parti-

Era	Diviziunea principală și perioada		Epocile Vîrsta în 10^6 ani	Forme de viață dominante
Terțiară (Cenozoică)	Cuaternar		Holocen	Plantele și animalele actuale Omul
			Pleistocen 1	
	Terțiar	Terțiar superior	Pliocen 13	Angiosperme Mamifere Păsări
			Miocen 25	
		Terțiar inferior	Oligocen 36	
			Eocen 58	
			Paleocen 63	
Secundară (Mezozoică)	Mezozoic superior	Cretacic superior	84	Gimnosperme superioare Reptile
		Cretacic mediu	110	
		Cretacic inferior	135	
	Mezozoic inferior	Jurasic	166	
		Triasic	230	
Primară (Paleozoică)	Paleozoic superior	Permian	280	Ferigi uriașe Amfibieni
		Carbonifer superior	320	
		Carbonifer inferior	340	
	Paleozoic mediu	Devonian	405	Plante terestre. Pești primitivi
		Silurian	425	Alge pluricelulare nevertebrate superioare
	Paleozoic inferior	Ordovician	500	
		Cambrian	600	
Eozoică (Proterozoică)	Algonkian (Precambrian)		2 600	Apar primele bacterii Alge și nevertebrate marine primitive
Arhaică (Azoică)	Anhidră (Oceanică)		3500	Fără viață (?)
Formarea pămîntului ~ 4500 x 10^6 ani				

Fig. 211. Evoluția geologică și succesiunea principalelor evenimente ale evoluției biologice, începînd de la apariția bacteriilor.

Scanned with OKEN Scanner

culare de mediu în care viața a apărut pe Pămînt, este numai tipul de nutriție al bacteriilor primitive, autotrof sau heterotrof.

Ipoteza cea mai veche în acest sens este aceea a *apariției inițiale a microorganismelor autotrofe*, care pot trăi în medii exclusiv anorganice, așa cum era cazul în perioada premergătoare apariției vieții pe Pămînt. Din autotrofe, s-ar fi diferențiat ulterior, prin mutație și selecție, organisme heterotrofe, care ar fi urmat o evoluție regresivă corespunzînd unei dependențe nutriționale din ce în ce mai mari față de mediu: la mutantele cu deleții specifice apare într-adevăr o diminuare a echipamentului enzimatic, deci și a capacității de biosinteză, care impune satisfacerea necesităților nutritive ale celulei pe seama unor substanțe complexe preformate din mediul înconjurător. Asemenea transformări în sensul auxotrofiei (deci al sporirii și complicării exigențelor nutritive) survin destul de curent și la formele actuale, ca urmare a unor mutații spontane sau induse. La limita extremă a heterotrofiei, recte a dependenței față de un aport nutritiv complex al mediului, se găsesc bacteriile parazite intracelulare și mai ales virusurile, care nu pot supraviețui decît în interiorul unei celule-gazdă vii, active din punct de vedere metabolic. Împotriva acestei ipoteze s-au ridicat unele obiecții. După datele biochimiei comparate, cu cît substanțele nutritive folosite de un organism sînt mai puține și mai simple, cu atît acesta trebuie să posede mai multe enzime, iar calea metabolică de la încorporarea alimentului primar și pînă la sinteza finală de constituenți celulari este mai lungă. De aceea, este greu de conceput posibilitatea apariției primare într-un mediu anorganic a unor celule autotrofe, a căror organizare structurală și funcțională este cu necesitate foarte complexă, autotrofia implicînd în mod obligatoriu un echipament enzimatic bogat și o mare capacitate de sinteză. Este mai plauzibilă deci concepția după care apariția vieții ar fi fost precedată, într-un mediu geochimic inițial anorganic, de desfășurarea unor procese fizico-chimice în cursul cărora s-ar fi format mai întîi substanțe organice simple (hidrocarburi) și apoi substanțe organice complexe (proteine, polinucleotide, enzime), după care ar fi început constituirea unor forme primitive de viață, pornind de la coacervate. Pe această linie teoretică se înscrie ipoteza prin care Haldane și Oparin explică, în mod independent, originea vieții.

După ipotezele lui Haldane și Oparin, primele viețuitoare de pe Pămînt au fost bacteriile heterotrofe saprofite anaerobe, a căror apariție, precedată de aceea a virusurilor primitive (protovirusuri), s-a produs pe seama unor sisteme moleculare neanimate, printr-o succesiune de etape care corespundeau unor complicări progresive ale sistemului. Astfel, apariția organismelor vii a fost precedată de formarea unor substanțe organice cu complexitate crescîndă, ca rezultat al interacțiunilor, la început întîmplătoare, ale atomilor și moleculelor din oceanul primitiv în reacții care se realizau cu ajutorul energiei eliberate prin descărcări electrice sau prin radiație. Lipsa microorganismelor care să le degradeze a permis acumularea acestor substanțe organice, iar interacțiunile lor chimice secundare au dus la formarea unor molecule cu complexitate încă și mai mare. În felul acesta, înainte de apariția oricărui sistem viu s-au format pe cale abiogenă — prin procese chimice spontane —

Scanned with OKEN Scanner

aminoacizi, glucide şi acizi graşi, baze purinice şi pirimidinice, apoi primii polimeri (polizaharide, proteine, acizii nucleici). Unele molecule mari şi stabile, şi anume molecula de ADN şi, uneori, aceea de ARN, sînt înzestrate cu proprietatea de replicare sau de „autoreproducere", în sensul că, o dată formată, molecula de acest tip serveşte ca tipar sau matriţă după care se fac, pornind de la precursori mai simpli din mediu, asamblarea unei replici sau copii moleculare identice cu ea. Iniţial ar fi apărut deci virusurile primitive, de tipul aşa-numit „protovirus", constînd probabil din cîte o moleculă de acid nucleic asamblată din constituenţi proveniţi direct din oceanul primitiv. Această moleculă, mai întîi „nudă", iar ulterior, în cursul evoluţiei, protejată de un înveliş proteic, devine, o dată cu apariţia primelor organisme celulare, o entitate corpusculară infecţioasă, care se comportă ca un parazit obligatoriu intracelular.

O lungă evoluţie a dus la transformarea unor molecule organice complexe în virusuri şi apoi în primele organisme celulare reprezentate probabil de bacteriile heterotrofe primitive („protobacterii"), care s-au hrănit la început cu substanţele organice formate pe cale abiogenă. Răspîndirea şi multiplicarea rapidă a protobacteriilor s-a însoţit de o degradare treptată a compuşilor organici acumulaţi în perioada de evoluţie „chimică", de formare a substanţei organice pe cale abiogenă. În această perioadă se stabilesc condiţiile fizico-chimice care există şi astăzi pe Pămînt şi, ca urmare, sinteza abiogenă a substanţelor organice realizată pe cale fotochimică nu mai este posibilă. Sinteza şi acumularea substanţelor organice devin în aceste condiţii apanajul organismelor vii. Apar pigmenţii fotosintetizanţi şi, o dată cu aceasta, microorganismele fotoautotrofe care prin fotoliza apei îmbogăţesc mediul în O_2, ceea ce permite apariţia metabolismului aerob. Potrivit deci acestei concepţii, autotrofele au derivat din heterotrofe, prin dobîndirea unor noi capacităţi de sinteză, adică printr-o dezvoltare a echipamentului enzimatic, ceea ce le-a dat posibilitatea de a folosi molecule mai simple şi mai mici pentru a face sinteze mai complicate.

Ipotezele lui Haldane şi Oparin evită ideea apariţiei bruşte a unei celule vii cu o activitate metabolică foarte complexă şi capabilă să-şi facă singură toate sintezele. Ulterior, microorganisme cu funcţii metabolice complementare s-au asociat simbiotic şi, eventual prin fuziune, au format celule cu un grad superior de organizare.

Pe măsură ce mediul s-a schimbat, au apărut, pe de o parte, forme noi de viaţă, prin achiziţia de proprietăţi noi adecvate noilor condiţii de mediu, iar pe de altă parte, relaţii de interdependenţă între vieţuitoare, unele organisme mai complexe, nou-apărute, creînd condiţii favorabile pentru supravieţuirea unor forme mai simple, dependente nutritiv de ele. Spre exemplu, apariţia O_2 în atmosferă şi încetarea sintezei abiogene a aminoacizilor a făcut ca organismele chimiotrofe să devină dependente de cele care utilizează energia luminoasă. Paralel a început să evolueze şi un proces opus de pierdere de proprietăţi metabolice, adică de diminuare a capacităţii de biosinteză, ca urmare a sărăcirii echipamentului enzimatic. La bacterii, evoluţia spre parazitism şi patogenitate este asociată cu pierderea posibilităţii heterotrofelor libere de a

Scanned with OKEN Scanner

folosi diferite substanțe nutritive din mediu. Astfel, se apreciază că toxigeneza ar reprezenta un moment premergător în dezvoltarea evolutivă în sensul parazitismului, întrucît ea constituie un factor favorizant al infecției prin efectele destructive pe care toxina le exercită asupra integrității țesuturilor gazdei. Dovada o constituie faptul că există și astăzi bacterii heterotrofe libere, incapabile să invadeze țesuturile gazdei, deci încă neadaptate la parazitism sau numai facultativ parazite, dar care elaborează toxine foarte puternice, așa cum sînt bacilul botulinic *(C. Botulinum)* sau bacilul tetanic *(C. tetani)*.

În cursul evoluției spre parazitism apar grade variabile de dependență față de gazdă, mergînd de la simple exigențe de substanțe nutritive complexe provenite din organismul acesteia și pînă la o dependență specifică foarte strictă de o anumită gazdă sau chiar de un anumit țesut sau celulă. Astfel, cele mai multe microorganisme patogene se pot dezvolta pe medii de cultură bogate în substanțe organice complexe și uneori specifice, în timp ce altele și-au pierdut capacitatea de a se dezvolta *in vitro* pe medii artificiale, așa cum sînt bacilul leprei, treponema sifilisului, rickettsiile și virusurile, care nu pot trăi decît în interiorul unor celule vii.

2. EVOLUȚIA LA BACTERII

Evoluția celulelor în biosferă constituie un proces continuu de dobîndire și pierdere de proprietăți metabolice, proces care are în mod evident un sens determinat, întrucît grație lui celula poate face față unei solicitări sporite din partea mediului care se schimbă și se diversifică neîncetat. Ca o consecință a pierderii unor proprietăți și a achiziției altora noi, bacteriile au intrat, pe de o parte, în relații simbiotice de mare complexitate cu alte organisme similare sau cu organizare superioară, iar pe de altă parte, au dobîndit unele diferențieri structurale și adaptări celulare specializate.

Carpenter (1965) propune o schemă generală de evoluție a plantelor, animalelor și microorganismelor, pornind de la ipoteza că protovirusul preistoric ar fi evoluat într-o primă etapă spre un stadiu de organism primitiv dar în bună parte similar bacteriilor actuale. Celula acestor bacterii primitive – protobacteria — ar fi căpătat treptat diferite structuri adiționale care i-au ameliorat capacitatea de supraviețuire. Au apărut astfel flagelii, care asigură o locomoție independentă, ceea ce a dat celulei bacteriene posibilități sporite de a-și alege hrana și un mediu mai favorabil. De la acest flagelat ancestral, evoluția a continuat probabil simultan în mai multe direcții, ducînd la apariția tuturor tipurilor de microorganisme actuale, a plantelor și a animalelor.

Încercările de reconstituire a căilor și sensului evoluției sînt expuse însă la erori în cazul oricărei ființe vii, și cu atît mai mult atunci cînd este vorba de bacterii, datorită, pe de o parte, lipsei de probe asupra filogeniei lor, iar pe de altă parte, marii plasticități structurale și funcționale a organismului acestor viețuitoare. Această plasticitate face ca celulele unei tulpini bacteriene să difere prin morfologia lor în funcție de compoziția mediului, iar în aceleași condiții de mediu să se prezinte sub un aspect polimorf — forme cocoide, bacilare sau chiar filamentoase — ca o expresie normală a creșterii în funcție de „fază"

Scanned with OKEN Scanner

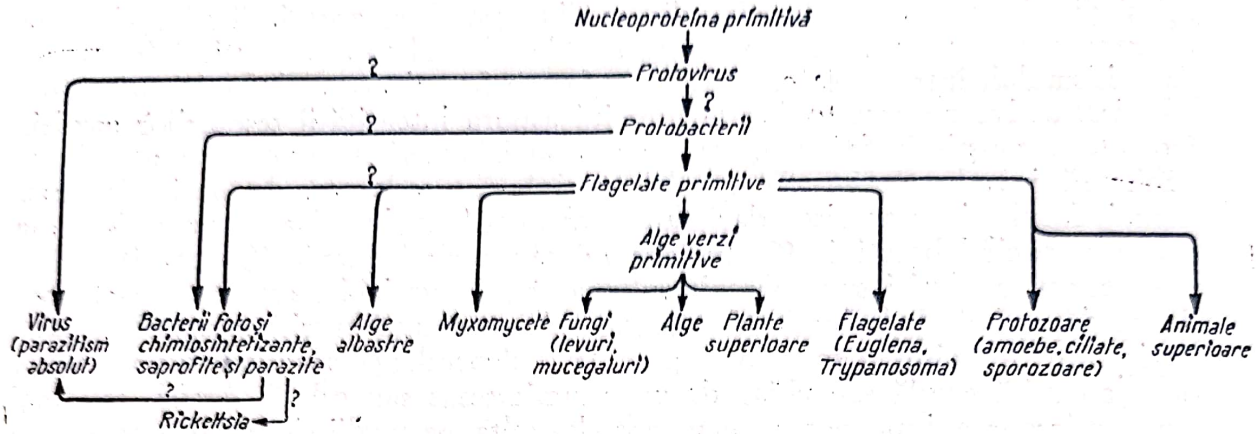


Fig. 212. Evoluţia ipotetică a microorganismelor, plantelor şi animalelor actuale, pornind de la nucleoproteina originară (după Carpenter). Semnele de întrebare marchează treptele de evoluţie asupra cărora nu există în prezent informaţii suficiente.

colonială în care se găsesc (culturi „S" sau „R" etc.). În afară de aceasta, unele formaţii structurale de mare importanţă taxonomică, precum sînt cilii, sporii sau capsula sînt prezente uneori numai în anumite condiţii, care nu totdeauna pot fi precizate, iar existenţa lor este asociată nu numai cu o anumită morfologie a celulei, ci şi cu un aspect caracteristic al culturilor şi cu unele însuşiri biologice particulare. În sfîrşit, diferite proprietăţi fiziologice, cum ar fi, de exemplu, capacitatea de sinteză a unor enzime, pigmentogeneza sau aptitudinea de elaborare a unor factori de creştere pot fi cîştigate sau pierdute reversibil, chiar de întreaga populaţie dintr-o cultură care porneşte de la o singură celulă, deci care reprezintă o clonă.

Cu toate aceste dificultăţi care grevează studiile asupra filogeniei bacteriilor, au fost propuse pînă în prezent mai multe scheme ale evoluţiei acestui grup de microorganisme:

1) Conform ipotezei lui Kluyver şi Van Niel (1946), toate tipurile morfologice de bacterii ar deriva dintr-o formă ancestrală comună, reprezentată de o celulă sferică similară tipului actual de coc. Caracterul originar primar al formei sferice, de coc, a bacteriilor ţine de aceea că în momentul apariţiei celulei vii tensiunea superficială ridicată a imprimat protoplasmei tocmai această formă geometrică, în care suprafaţa expusă acţiunii mediului extern este minimă în raport cu volumul. Celelalte tipuri morfologice bacteriene s-au constituit prin deformarea celulei sferice, o dată cu dezvoltarea unui perete celular rigid capabil prin rezistenţa sa sporită să contrabalanseze acţiunea forţelor de suprafaţă.

În grupul cu morfologia cea mai simplă — *Micrococcaceae* — celulele sînt sferice sau sferoidale. Forma primitivă ar fi aceea de coc izolat din care, prin evoluţie, ar deriva cocii care au tendinţa de a rămîne uniţi în perechi, tetrade, lanţuri sau grămezi. Grupul presupus următor în evoluţie — *Mycobacterium* — ar avea ca strămoşi cocii liberi, iar ca forme de tranziţie streptococii. Datorită unor forţe interne, celulele ar fi început să manifeste o tendinţă de alungire,

Scanned with OKEN Scanner

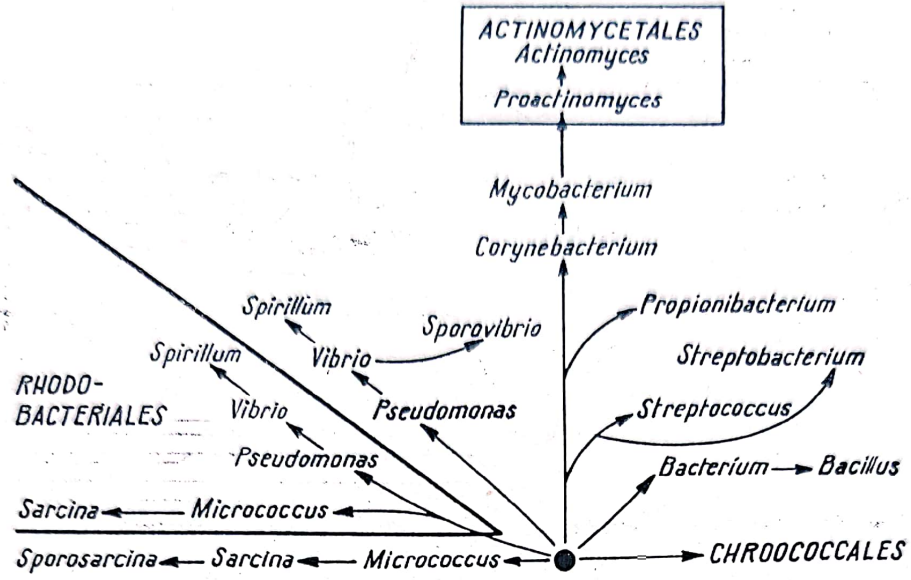


Fig. 213. Filogenia Eubacterialelor şi a grupurilor înrudite după schema lui Kluyver şi Van Niel. Denumirile folosite se referă la entităţi morfologice şi nu în mod obligatoriu la genuri.

ceea ce ar fi avut ca rezultat mai întîi apariţia unor bacili grupaţi în lanţuri scurte (de exemplu, *B. acidi-lactici*). Din asemenea bacili ar fi derivat apoi forme ramificate, la care celula are un aspect neregulat, iar capacitatea de a se dispune în lanţuri se exprimă tot mai rar, ceea ce a făcut posibilă constituirea în acest grup a unui tip morfologic mai complex, reprezentat, de exemplu, de *Myc. tuberculosis* şi apoi de actinomicete. Bacteriile încurbate şi cele spiralate — *Pseudomonas, Vibrio, Spirillum* — au avut probabil ca punct de plecare un coc monoflagelat. Flagelarea a determinat devierea de la forma de coc la aceea de bacil, apoi la cea de bacil cu flagel polar şi, în sfîrşit, la formele curbate. În sfîrşit, bacilii peritrichi — *Bacteriaceae* — au evoluat din cocii cu mai mulţi flageli, în timp ce bacilii neflagelaţi ar proveni fie din coci neflagelaţi, fie din bacili flagelaţi care şi-au pierdut flagelii. Sporogeneza şi caracterul de Gram-pozitivitate s-ar fi dezvoltat independent de această evoluţie morfologică a celulei.

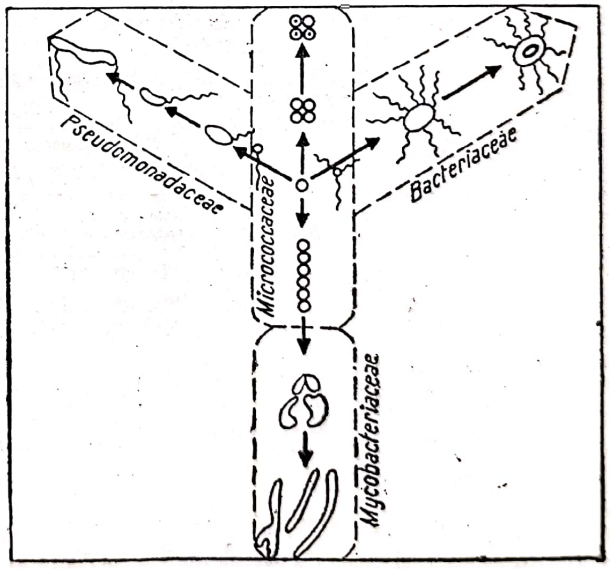


Fig. 214. Schema evoluţiei ipotetice a bacteriilor (după Kluyver şi Van Niel). Pornind de la o bacterie sferică primitivă s-au diferenţiat cele patru linii principale de evoluţie a bacteriilor: *Micrococcaceae, Pseudomonadaceae, Bacteriaceae* şi *Mycobacteriaceae*.

Scanned with OKEN Scanner

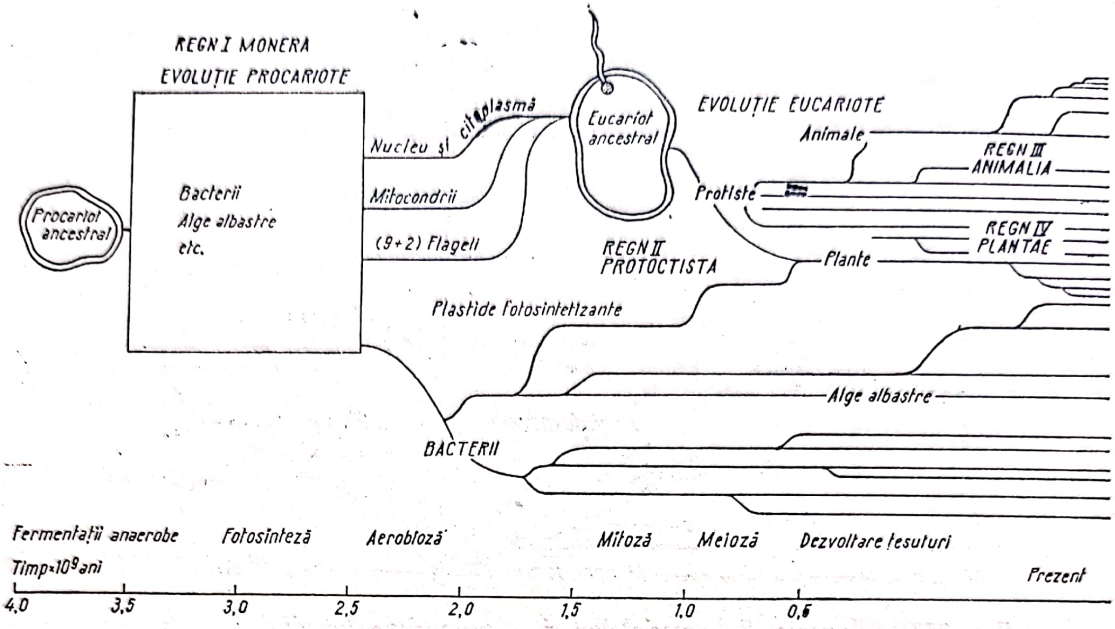


Fig. 215. Reprezentare diagramatică a evoluției ipotetice a organismelor vii după concepția lui L. Sagan Margulis.

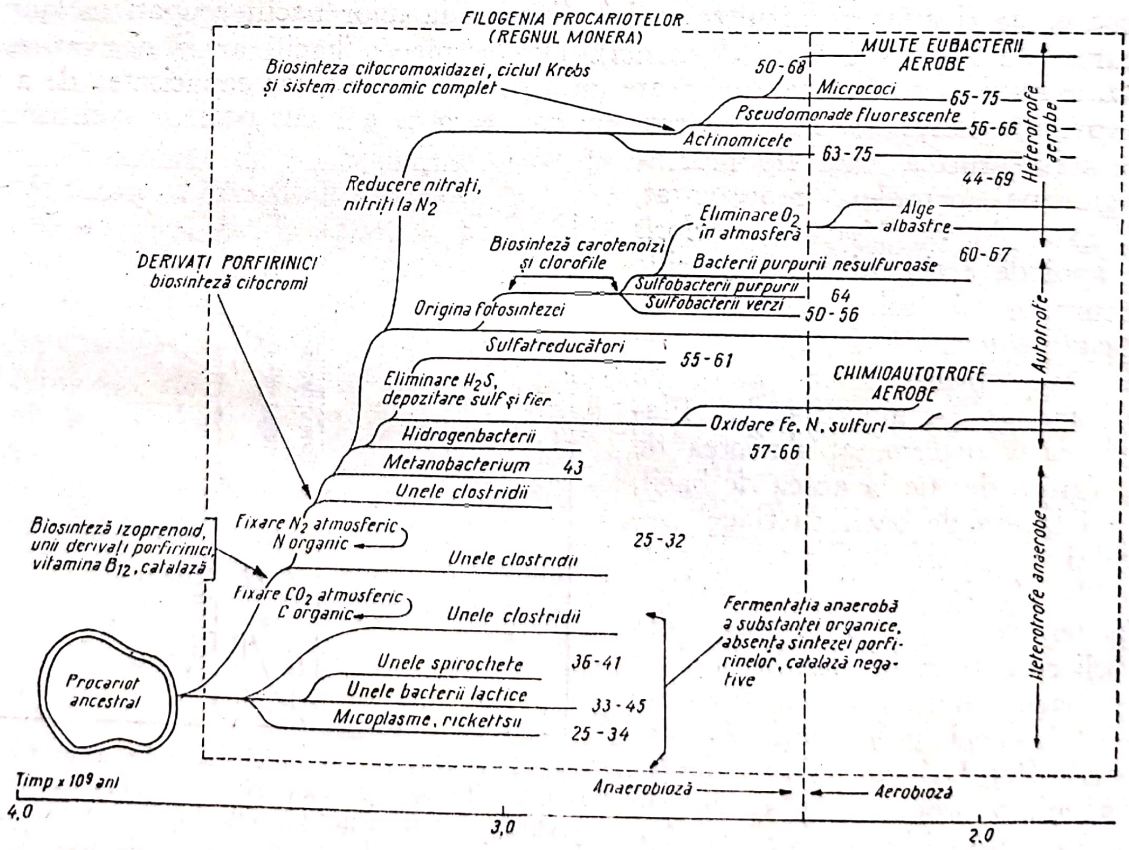


Fig. 216. Reprezentare diagramatică a evoluției procariotelor după L. S. Margulis. Numerele reprezintă raportul bazelor în moleculele ADN exprimat în % guanină+citozină.

2) După K. A. Bisset (1952), cele mai primitive bacterii sînt formele spiralate acvatice. Evoluția lor a mers pe două căi, și anume: pe de o parte — în ceea ce privește habitatul — de la modul de viață acvatic la cel terestru, iar pe de altă parte, sub raportul metabolismului, de la forme mai puțin exigente ca nevoi nutritive, la specii mai exigente, ca urmare a pierderii unor capacități de sinteză.

După această concepție, bacteriile cele mai bine adaptate la existența acvatică sînt spirilii cu flagel polar. Flagelii peritrichi s-au dezvoltat pe măsura adaptării unor celule bacteriene la creșterea pe suprafețe solide umede, acest tip de dispoziție a cililor permițînd deplasarea celulelor prin roire. Bacilii neflagelați, ca și cocii, s-ar fi dezvoltat printr-o evoluție regresivă. Caracterul de germen Gram-pozitiv ar fi apărut o dată cu pierderea unor capacități de sinteză și cu adaptarea bacteriilor la viață terestră, deși există și excepții în această privință.

Recent (1968) Lynn Margulis a propus o nouă schemă a criteriilor de evoluție a microorganismelor și a organismelor superioare, pornind de la premisa că celulele eucariote au luat naștere din strămoși procarioți în Precambrianul tîrziu, ca urmare a unor serii de simbioze specifice. Schema sa (ilustrată în figurile 215 și 216) este în acord cu datele actuale de citologie, cu concluziile rezultate din evaluarea raportului bazelor în moleculele de ADN și cu informațiile furnizate de studiul fosilelor.

Scanned with OKEN Scanner

PRINCIPII DE SISTEMATICĂ BACTERIANĂ

Ca şi în alte domenii ale biologiei, curînd după descrierea unui număr mai mare de microorganisme, cercetătorii din domeniul microbiologiei au simţit nevoia organizării şi sistematizării materialului acumulat.

Reunite iniţial sub denumirea de „animalcula" (Leeuwenhoek, 1967) şi grupate apoi în grupul „Chaos" (Linnaeus, secolul al XVIII-lea), microorganismele au fost pentru prima oară clasificate într-un sistem ordonat de către Otto Müller în anii 1773 şi 1786. Ulterior, pentru clasificarea bacteriilor au fost elaborate cîteva sisteme care aveau ca unitate de bază specia şi erau alcătuite numai pe criterii morfologice (F. Cohn, 1872), după morfologie, caractere de cultură şi unele proprietăţi fiziologice (Migula, 1897) sau exclusiv după proprietăţile fiziologice ale speciilor (Orla Jensen, 1909). În prezent sînt în uz mai multe sisteme de clasificare care reprezintă punctele diferite de vedere ale diverşilor bacteriologi (Bergey, Prévot, Krasilnikov, Skerman, Engler ş.a.) şi includ numai aproximativ 10—15% din numărul total al speciilor bacteriene existente în natură, respectiv speciile cu importanţă medicală, agricolă, industrială sau cu anumite caracteristici şi activităţi biologice particulare.

Sistematica este studiul însuşirilor tipice ale unui număr mare de unităţi sau indivizi, efectuat în vederea identificării particularităţilor comune şi a caracterelor lor diferenţiale, care să permită sortarea lor pe grupuri („taxa"), după gradul de înrudire şi aranjarea lor într-un sistem de categorii ierarhizate.

Sistematica biologică, numită şi *taxonomie* (de la gr. sing. *taxon*, pl. *taxa*=grup) este o ramură a biologiei, care are drept scop gruparea ordonată şi clasificarea diferitelor specii de microorganisme, plante şi animale după interrelaţiile lor naturale, urmărind în acelaşi timp şi stabilirea unei nomenclaturi corecte. Ea însumează trei domenii de preocupare: *a*) *clasificarea*, aranjarea ordonată a indivizilor sau a unităţilor de bază în grupe de unităţi mai mari, în aşa fel încît determinarea gradului de asemănare să permită deducerea prin analogie a celorlalte caracteristici; *b*) *nomenclatura*, denumirea corectă a unităţilor definite şi delimitate prin clasificare; *c*) *identificarea unităţilor necunoscute*.

Taxonomia este o ştiinţă în permanentă dinamică, fiind obligată să realizeze o sinteză, mereu actualizată, a tuturor cunoştinţelor achiziţionate în biologie, pe baza cărora să poată exprima, în puţine cuvinte, definiţia speciilor de orga-

Scanned with OKEN Scanner

nisme grupate după relaţiile lor filogenetice. Ea reprezintă pentru specialişti un instrument practic de excepţională importanţă, deoarece le pune la îndemînă un îndreptar pentru identificarea organismelor studiate.

Studiul plantelor şi animalelor superioare a arătat că ele pot fi clasate în mai multe *tipuri biologice* distincte, definite printr-un număr mare de caractere comune care sînt uşor de determinat, deoarece organismele grupate pe baza lor aparţin unei ramuri unice de evoluţie şi, ca atare, au o mai mare înrudire genetică între ele decît cu alte organisme construite după un model diferit. Recunoaşterea acestui fapt a determinat o tendinţă firească de a grupa organismele într-un mod care să exprime cel mai bine gradul lor de înrudire stabilită în cursul evoluţiei. Clasificări bazate pe acest principiu — numite clasificări naturale sau filogenetice — au apărut încă de la începutul secolului al XVIII-lea sub influenţa ideilor lui Aristotel dezvoltate de Linné şi s-au înmulţit şi perfecţionat după ce valabilitatea teoriei filogenetice a evoluţiei propusă de Darwin a fost recunoscută.

Ele pornesc de la premisa că în natură există o ordine care poate fi descoperită printr-o cercetare atentă, capabilă să dezvăluie interrelaţiile filogenetice existente în lumea vie. Dacă pentru organismele superioare identificarea relaţiilor de înrudire între specii este în general uşoară, dificultăţile de investigare în această direcţie cresc progresiv, pe măsura abordării unor organisme tot mai puţin complexe, pentru ca la bacterii determinismul filogenetic al grupării naturale să devină practic insensibil. Datele foarte sumare furnizate de studiul fosilelor bacteriene nu permit elaborarea unui sistem natural, filogenetic, de clasificare a bacteriilor, sistem care să le pună în evidenţă direcţiile de evoluţie. De aceea, taxonomia bacteriană urmăreşte mai curînd o clasificare convenţională a acestor microorganisme, prin care să se realizeze gruparea lor în aşa fel încît organismele să fie încadrate în diviziunile sistematice, în funcţie de asemănările lor, trecîndu-se cu vederea caracterele necomparabile sau discordante.

Clasificările bazate pe acest principiu urmăresc, pe lîngă satisfacerea unui scop utilitar, şi realizarea unei ordonări cît mai logice a organismelor în cadrul sistemului, cu toate că în realitate ele sînt în mare măsură — şi în mod inevitabil — arbitrare şi subiective, deoarece rezultă din cercetarea numai a *anumitor* caractere, alese, cu ignorarea deliberată a tuturor celorlalte. Spre deosebire de clasificarea ideală, care este în mod obligatoriu unică, întrucît reflectă ierarhia filogenetică reală, clasificările convenţionale pe bază de asemănare pot fi numeroase, întrucît exprimă puncte de vedere diferite relativ la selecţia caracterelor definitorii, selecţie care, oricum, rămîne subiectivă şi mai mult sau mai puţin arbitrară.

Taxonomia bacteriilor se loveşte în practică de dificultăţi mari, care se datoresc în primul rînd faptului că microbiologul, spre deosebire de alţi biologi, este nevoit să studieze aceste microorganisme nu ca indivizi, ci ca populaţii şi, în plus, nu în mediul lor natural, ci izolate de acesta, în condiţii artificiale de laborator. Întrucît în laborator nu se pot reproduce niciodată întocmai condiţiile naturale de trai ale bacteriilor, caracterele fenotipice ale acestora se pot modifica în anumite limite fixate de genotip, deoarece genotipul — care este

Scanned with OKEN Scanner

stabil — poate avea diferite expresii fenotipice în funcţie de natura mediului. Pentru acest motiv şi, mai ales, pentru că variabilitatea sub influenţa condiţiilor de mediu se produce foarte rapid la microorganisme, în aprecierea caracterelor acestora trebuie să se ţină seama de faptul că studiul în condiţii de laborator nu permite evidenţierea fenotipului natural al germenului dat, ci numai observarea fenotipului corespunzător situaţiei artificiale în care acesta este pus. Pentru a se preîntîmpina erorile care decurg dintr-o asemenea situaţie, este necesar ca studiul tulpinilor microbiene să fie făcut cît mai curînd după izolarea lor din mediul natural şi pe un mediu de cultură cît mai apropiat de cel natural, iar rezultatele obţinute trebuie raportate la condiţiile de lucru respective.

1. CONCEPTUL DE SPECIE BACTERIANĂ

Una dintre dificultăţile majore care grevează studiile de sistematică bacteriană constă în faptul că, în ceea ce priveşte bacteriile, noţiunea de specie nu este încă bine precizată sub raportul extinderii sau limitelor ei. Datorită acestui fapt, concepţiile autorilor moderni variază de la considerarea speciei bacteriene ca o unitate fundamentală de ordin biologic şi nu numai sistematic şi pînă la negarea semnificaţiei ei biologice, contrastînd cu recunoaşterea acestei semnificaţii în cazul speciilor vegetale şi animale, deci pînă la evaluarea noţiunii de specie bacteriană ca arbitrară, subiectivă şi lipsită de conţinut real, admisibilă doar în virtutea utilităţii ei taxonomice (Lwoff, Cowan etc.).

Rezolvarea acestei probleme de ordin teoretic este îngreuiată de faptul că nici unul dintre criteriile de importanţă biologică majoră, aplicate în cazul plantelor şi animalelor, nu este utilizabil pentru definirea speciei bacteriene. Dificultăţi mari în această privinţă sînt legate de luarea în considerare a unuia dintre criteriile taxonomice fundamentale, acela al fecundităţii intraspecifice şi infecundităţii interspecifice. Astfel, cercetări experimentale au demonstrat posibilitatea încrucişării şi recombinării genetice între *Escherichia coli* şi *Shigella dysenteriae*, ceea ce demonstrează că aceste bacterii fac parte din aceeaşi specie biologică (genospecie), deşi ele sînt considerate de bacteriologi ca reprezentînd specii înrudite dar distincte, punct de vedere care, de altfel, rămîne justificat pentru numeroase considerente de ordin practic.

Unii autori propun ca unitate fundamentală de clasificare clona, care reprezintă populaţia bacteriană circumscrisă într-un spaţiu determinat şi compusă din celule derivate toate pe cale asexuată, prin diviziuni succesive, dintr-o unică celulă parentală. După Prévot, specia constă din totalitatea clonelor identice.

Astfel definită, noţiunea de specie implică omogenitate fiziologică absolută sub raportul caracterelor principale (echipament enzimatic, metabolism, acţiune patogenă specifică şi, dacă este cazul toxigeneză), dar nu este incompatibilă cu o oarecare eterogenitate în ceea ce priveşte modul de manifestare al acestor caractere (nivelul activităţii enzimatice, gradului de virulenţă, aspectul cantitativ al toxigenezei etc.). Pornind de la observaţia că transferul genetic realizat prin fenomene de sexualitate are la bacterii o incidenţă foarte scăzută,

Scanned with OKEN Scanner

L w o f f consideră că pentru aceste microorganisme este mai adecvată utilizarea conceptului de specie asexuată. Specia bacteriană ar fi în acest caz definită ca o populaţie formată din unul sau mai multe *biotipuri* care se reproduc asexuat, biotipul reprezentînd un grup de indivizi care posedă, în esenţă, acelaşi patrimoniu ereditar şi, în consecinţă, sînt cu necesitate asemănătoare prin marea majoritate a caracterelor.

În ciuda încercărilor de a se ocoli dificultăţile menţionate, definirea noţiunii de specie bacteriană rămîne încă foarte anevoioasă, întrucît nici una dintre formulările existente pînă în prezent nu satisfac toate exigenţele de ordin teoretic. Aceasta explică, pe de o parte, caracterul convenţional şi subiectiv al sistemelor actuale de clasificare a bacteriilor, iar pe de altă parte, faptul că mulţi microbiologi recurg totuşi la definiţii şi delimitări provizorii care, deşi deficitare sub raport teoretic, au cel puţin meritul de a fi utilizabile în practică, atunci cînd este necesară identificarea unei anumite tulpini bacteriene.

2. CRITERIILE DE CLASIFICARE A BACTERIILOR

Identificarea şi clasificarea bacteriilor trebuie să folosească în mod obligatoriu un număr cît mai mare de caractere distinctive de ordin morfologic, biochimic, fiziologic, antigenic, ecologic etc., uşor de observat şi relativ stabile, independent de modificările mediului. În identificarea unei bacterii trebuie să se ţină seama în special de caracterele *unitare*, adică de acelea asupra cărora nu poate exista echivoc şi care nu se prezintă sub forme intermediare (de exemplu, sporogeneza, fermentarea unui anumit zahăr). Caracterele *neunitare*, care exprimă nivelul cantitativ al unei activităţi a microorganismului (de exemplu, cantitatea de alcool sau de acid produsă prin fermentarea unui substrat) nu sînt indicate drept criterii de clasificare.

Caracterele morfologice şi tinctoriale (formă, cili, capsulă, spori etc., şi, respectiv, colorabilitatea cu coloranţi de anilină, reacţia Gram etc.) reprezintă un criteriu preliminar, necesar pentru plasarea unei tulpini necunoscute într-o subdiviziune primară, deoarece asemenea caractere nu pot diferenţia între ele specii înrudite. În unele cazuri însă, ele pot fi utilizate în practică drept un prim criteriu de diagnostic (de exemplu, prezenţa bacilului tuberculozei în sputa unui bolnav). Cercetările efectuate în ultimii ani asupra ultrastructurii şi mai ales asupra structurii moleculare a unor constituenţi celulari, aşa cum este, de exemplu, peretele celular, foarte deosebit anatomic şi biochimic în funcţie de caracterul Gram al bacteriilor, au determinat o reevaluare a semnificaţiei taxonomice a caracterelor morfologice, în special pentru studiile speciale de taxonomie.

Caracterele fiziologice, reprezentate de limitele de temperatură, *p*H şi *r*H care permit multiplicarea, reacţia la presiunea osmotică, aptitudinea de a produce anumiţi metaboliţi intermediari sau finali (alcooli, acizi organici, toxine etc.), trebuie folosite cu prudenţă din cauza marii plasticităţi funcţionale a celulei bacteriene.

Caracterele de cultură, privind aspectul macroscopic al culturilor pe medii solide şi lichide, precum şi exigenţele caracteristice faţă de substanţele nutritive

Scanned with OKEN Scanner

şi factorii de creştere, constituie, de asemenea, luate izolat, un criteriu insuficient pentru diferenţierea speciilor.

Caracterele biochimice, reprezentate de capacitatea de a folosi anumite glucide sau anumiţi alcooli, de a degrada diverse substanţe azotate, de a metaboliza substraturi specifice ale unor enzime, de a se dezvolta în prezenţa sau în absenţa O_2, indică în general diferenţe specifice de înzestrare enzimatică, deşi unele specii se pot asemăna destul de mult între ele din acest punct de vedere.

Caracterele antigenice (serologice) sînt deosebit de importante, deoarece permit identificarea unui microorganism, respectiv a unui antigen, necunoscut, prin punerea lui în contact cu un anticorp cunoscut (de exemplu, un ser imun preparat prin imunizarea unui animal cu o tulpină standard), în diferite reacţii serologice (aglutinare, precipitare, fixare a complementului etc.).

Caracterele ecologice, privind habitatul natural al germenului şi relaţiile lui în mediul natural cu alte forme de viaţă, trebuie folosite cu discernămînt la bacterii, deoarece pot varia în funcţie şi de alţi factori decît cei proprii speciei date, precum şi pentru faptul că una şi aceeaşi specie bacteriană poate trăi în medii naturale foarte diferite. Aceste caractere au o deosebită importanţă taxonomică la virusuri care, uneori, nu pot parazita decît o singură gazdă sau chiar un singur ţesut sau celulă.

Caracterul de patogenitate, a cărui manifestare depinde în primul rînd de virulenţă, este de asemenea relativ şi neunitar deoarece, pe de o parte, virulenţa variază cu tulpina şi se poate atenua sau chiar pierde în culturi de laborator, iar pe de altă parte, eficacitatea acţiunii patogene depinde şi de receptivitatea individuală a gazdei folosite pentru evidenţierea ei. Lamanna şi Mallette citează, ca un exemplu pentru riscurile care decurg din folosirea excesivă a patogenităţii drept caracter taxonomic, cazul bacteriei *Pseudomonas pyocyanea*, agent patogen cunoscut la animale şi capabil să producă infecţii naturale şi la plante, în acest caz însă descris independent sub denumirea de *Pseudomonas polycolor*.

Sensibilitatea la bacteriofag, caracter folosit mai ales în microbiologia medicală pentru identificarea speciilor şi a tipurilor, are o valoare taxonomică reală dar limitată de faptul că numai puţini fagi sînt monovalenţi şi pot, ca atare, să servească pentru determinarea unei specii, cei mai mulţi dintre ei fiind polivalenţi, deci inutilizabili în acest scop.

În folosirea acestor criterii trebuie să se ţină seamă de variabilitatea caracterelor corespunzătoare care, la unele bacterii, poate fi foarte mare, chiar de la o tulpină a aceleiaşi specii la alta. În general însă această variabilitate este caracteristică, în sensul că oscilează între anumite limite determinate, în aşa fel încît, interpretate cu prudenţă, caracterele susceptibile de variaţie pot avea valoare taxonomică.

Ca o conduită generală, întrucît caracterele amintite sînt asociate în mod diferit, în funcţie de specie, şi pentru a se evita riscul de eroare datorită variabilităţii unora dintre ele, este necesar ca pentru determinarea speciei bacteriene să se ţină seama de întreaga lor diversitate, folosindu-se pe cît posibil o gamă cît mai largă de criterii definitorii.

Scanned with OKEN Scanner

3. IMPORTANȚA STRUCTURII GENETICE PENTRU TAXONOMIA BACTERIANĂ

Genetica bacteriană furnizează un număr important de date comparative privind bazele chimice și biologice ale eredității la bacterii. Gradul de homologie genetică dintre diverse tulpini bacteriene poate fi apreciat la nivel de genom prin posibilitatea realizării între ele a proceselor de transfer genetic (transformare, conjugare, transducție) și, mai ales, prin frecvența cu care materialul genetic transferat de la celula donatoare este integrat prin recombinare în genomul celulei receptoare. În general frecvența de recombinare reprezintă un indicator fin al homologiei dintre donator și receptor, deoarece cu cît înrudirea genetică a acestor parteneri celulari este mai strînsă, cu atît frecvența de integrare a fragmentului de genom este mai mare. La nivel molecular, gradul de homologie genetică poate fi apreciat prin diferite tehnici fizico-chimice, în funcție de proporția și de aranjarea unităților monomere constitutive în structura ADN și prin posibilitatea de hibridizare a moleculelor ADN.

O deosebită semnificație are în această privință conținutul în *GC* (guanină+citozină) al ADN, reflectat de raportul $(G+C)/(G+C+A+T)$ sau $GC\%$. La bacterii, valoarea acestui raport variază între 0,27 și 0,75, în timp ce la plantele superioare și la animale — vertebrate și nevertebrate — ea este relativ uniformă, fiind cuprinsă între 0,35 și 0,48. Gama largă de variație a conținutului ADN bacterian în *GC* a și permis utilizarea lui drept criteriu de omologie genetică la bacterii. Cu unele excepții există într-adevăr o strînsă corelație între conținutul *GC* și poziția sistematică a diferitelor bacterii, în sensul că microorganismele considerate de sistematicieni ca strîns înrudite, așa cum sînt, de exemplu, cele din grupul *Escherichia* — *Shigella* — *Salmonella* — s-au dovedit a avea și un conținut în *GC* aproape identic, echivalent cu 50—52% (Sueoka, 1961). În ceea ce privește omologiile de aranjare a subunităților de construcție a ADN, ele pot varia de la prezența unor secvențe identice de baze și pînă la existența unei ordini identice a genelor în cromozom. Se admite că două tulpini bacteriene aparțin din punct de vedere genetic aceleiași specii — genospecie — dacă prezintă un grad ridicat de homologie la nivelele amintite.

Deși nu oferă în măsură suficientă elementele de bază ale unei clasificări naturale, datele de genetică bacteriană contribuie totuși în mod eficient la elaborarea unui sistem de clasificare care să reflecte cît mai mult posibil relațiile filogenetice ale diferitelor grupe de bacterii prin gradul lor de înrudire ereditară și potențialul lor de a avea descendenți cu caractere comune.

Clasificarea adansoniană. În 1957, Sneath preconizează clasificarea bacteriilor pe baza principiilor preconizate de Adanson încă din 1757. Spre deosebire de taxonomia convențională, care are în vedere un număr limitat de caractere pe care le apreciază în funcție de presupusa lor importanță din punctul de vedere al evoluției, clasificarea adansoniană — denumită de Sneath și Sokal (1963) *taxonomie numerică* sau *taxometrie* — are la bază principii complet diferite. Principiile acestei clasificări strict fenotipice sînt următoarele: *1*) analiza unui număr mare de caractere (60—200), care sînt considerate ca avînd o pondere egală, indiferent de natura lor (caractere morfologice, biochimice, antigenice etc.); *2*) gruparea microorganismelor în

raport cu un parametru abstract — coeficientul de asemănare globală (*over-all similarities*) al tulpinilor studiate, parametru care este independent de orice speculaţie filogenetică, fiind reprezentat de raportul dintre numărul de caractere pozitive comune tulpinilor studiate şi numărul total de caractere luate în considerare (în mod intenţionat caracterele negative sînt ignorate în clasificare); *3*) folosirea drept unităţi taxonomice a tulpinilor bacteriene, ceea ce permite repartizarea lor în *phenoni*, grupuri sistematice care aproximează grupurile naturale. Taxonomia numerică înlocuieşte noţiunea de specie cu aceea de *pleiston* (taxospecie). Datorită complexităţii operaţiilor de calcul, aprecierea asemănărilor naturale dintre bacterii prin taxometrie se face cu ajutorul calculatoarelor electronice (*computers*).

4. NORME GENERALE DE NOMENCLATURĂ A BACTERIILOR

Cu toate discuţiile controversate privind definirea speciei bacteriene, „Codul Internaţional de nomenclatură a bacteriilor" (1966) — care prevede principiile, regulile şi recomandările privind stabilirea denumirilor noi şi a priorităţii lor — consideră drept categorie taxonomică de bază s p e c i a şi admite următoarele categorii taxonomice principale în succesiunea lor ascendentă: specia, genul, familia, ordinul, clasa şi diviziunea.

Potrivit acestor norme, fiecare microorganism este denumit, după sistemul binominal al lui Linné, prin două cuvinte latinizate (de exemplu, *Bacillus subtilis*), care caracterizează foarte sintetic microorganismul dat. Primul cuvînt, care indică genul, este un substantiv la singular de origine latină, greacă sau oricare alta, dat latinizat. El desemnează anumite trăsături morfologice (*Bacillus*=baston mic; *Micrococcus*=grăunte mic; *Sarcina*=pachet), uneori asociate cu habitatul natural al bacteriei (*Lactobacillus*=bastonaş mic din lapte) sau este derivat din numele unor oameni de ştiinţă (*Pasteurella*=Pasteur, *Escherichia*=Escherich). Numele genului se scrie cu iniţială majusculă şi poate fi prescurtat (*B. subtilis*). Cel de-al doilea cuvînt — epitetul specific — este în general descriptiv pentru substantivul care reprezintă genul şi se referă la culoare, sursă, boala produsă, descoperitor sau orice alt element distinctiv. El poate fi, după caz: *1*) un adjectiv acordat în gen cu numele generic (*Bacillus albus, Sarcina aurantiaca, Spirillum rubrum*); *2*) un adjectiv în forma participiului prezent al unui verb (de exemplu, *Clostridium dissolvens*, care este capabil să dizolve; *3*) un substantiv la genitivul posesiv (*Streptococcus lactis*, streptococul laptelui; *Diplococcus pneumoniae* (diplococul pneumoniei); *4*) un substantiv în apoziţie, cu rol explicativ (*B. radicicola*, care trăieşte pe rădăcini); *5*) un nume propriu, în cazul genitiv (*Proteus rettgeri*) sau un adjectiv derivat dintr-un nume propriu (*Clostridium pasteurianum*). Epitetul specific se scrie totdeauna cu iniţială mică şi nu se prescurtează.

În unele cazuri, denumirea speciei este urmată de un singur nume, acela al descoperitorului ei, sau de două nume, al celui care i-a dat primul numele şi al celui care l-a clasat; de exemplu: *Micrococcus luteus* — Schroeter (Cohn). În alte cazuri, numele ca atare al descoperitorului lipseşte, fiind folosit pentru

Scanned with OKEN Scanner

formarea epitetului specific, de exemplu *Cl. welchii* (Migula) Holland, descoperit de Welch, denumit de Migula în onoarea acestuia şi plasat în sistematică de Holland. Pentru speciile de bacterii, ca şi pentru plante şi animale, se folosesc două feluri de denumiri, care trebuie bine diferenţiate: numele ştiinţific acceptat internaţional (*Mycobacterium tuberculosis*) şi numele comun sau vernacular (bacilul tuberculozei, bacilul lui Koch etc.).

Tulpina bacteriană este o cultură pură a unei specii provenind din descendenţii unei singure izolări din mediul natural; în mod obişnuit ea este denumită adăugîndu-se la numele de specie numele persoanei care a făcut izolarea, al localităţii, un număr sau un alt semn convenţional de laborator.

Unele specii sînt subdivizate în subspecii sau varietăţi cu denumiri latine. De exemplu, *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (varietatea provenită de la om). Codul de nomenclatură bacteriană prevede de asemenea şi diviziuni infrasubspecifice, taxoni de rang inferior subspeciei, ca biotipul sau tipul fiziologic, serotipul, tipul morfologic, fagotipul sau lizotipul etc., bazate respectiv pe diferenţe biochimice, serologice, morfologice şi de sensibilitate la fag.

Genul reprezintă un grup taxonomic format din mai multe specii înrudite cu specia tip. El poate fi format dintr-o singură specie (gen monotipic) sau, obişnuit, din mai multe specii.

Familia este un grup format din mai multe genuri înrudite, dintre care unul este denumit genul tip. Numele familiei se formează de la numele genului tip + sufixul — *aceae*, adăugat la rădăcina numelui generic. De exemplu: *Bacillus* — *Bacillaceae; Spirochaeta* — *Spirochaetaceae.*

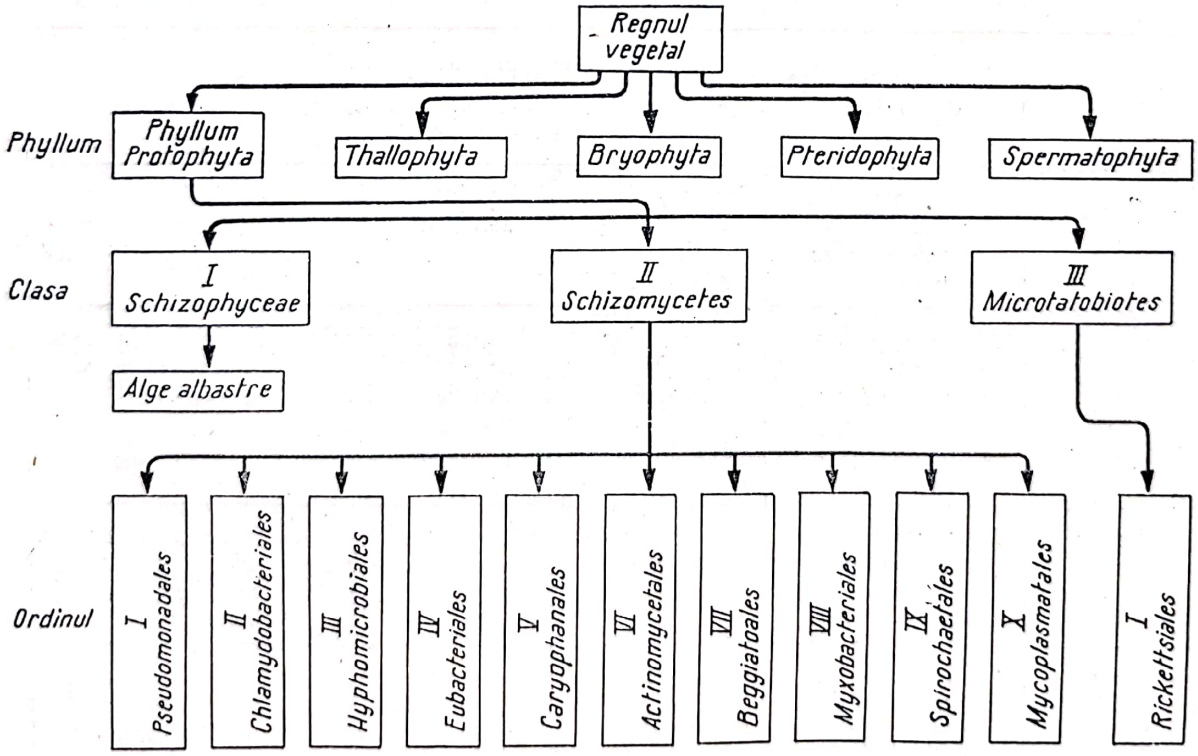


Fig. 217. Clasificarea bacteriilor şi poziţia lor în regnul vegetal (după Bergey).

Scanned with OKEN Scanner

Ordinul este constituit dintr-un grup de familii înrudite şi este denumit prin substituirea cu sufixul — *ales* a sufixului — *aceae* din numele familiei tip: *Spirochaetaceae* — *Spirochaetales*.

Clasa este un grup taxonomic format din mai multe ordine înrudite.

Diviziunea (Phyllum) este constituită dintr-un grup de clase înrudite.

După sistemul utilizat în determinatorul lui Bergey, bacteriile formează clasa *Schizomycetes* din diviziunea (phyllum) *Protophyta* a regnului vegetal. Denumirile acestor grupuri taxonomice exprimă în cuvinte greceşti sau latine una dintre caracteristicile principale ale grupului. De exemplu, *Protophyta*= plantă primordială, de la *protos*=primul (în timp), primordial, şi *phytum*= plantă; *Schizomyceta* — ciuperci care se înmulţesc prin diviziune, de la *schiza*=diviziune şi *myces* — *mycetis*=ciupercă.

Engler, în determinatorul său folosit curent în botanica sistematică, repartizează bacteriile în diviziunea *Bacteriophyta* (*Schizomycophyta*) a regnului vegetal, în timp ce Stanier le grupează în regnul *Protista* creat de Haekkel (1866), împreună cu toate organismele unicelulare, coenocitice sau pluricelulare lipsite de diferenţiere celulară, deci avînd o organizare biologică relativ simplă în raport cu aceea a plantelor şi animalelor superioare.

În sfîrşit, Copeland (1956) le încadrează în regnul *Monera* împreună cu celelalte organisme procariote (algele albastre) (tab. 16).

TABELUL 16

CLASIFICAREA ORGANISMELOR ÎN REGNURI DUPĂ MOMENTUL APARIŢIEI ŞI EVOLUŢIA LOR SUB INFLUENŢA FACTORILOR DE SELECŢIE DIN MEDIU

(după Copeland)

Regnul	Exemple de organisme	Timp aproximativ de evoluţie (milioane de ani anterior)	Proprietăţi esenţiale constituite sub influenţa acţiunii selective a mediului	Cel mai important factor selectiv
Monera	Toate procariotele: bacterii, actinomicete, alge albastre	Precambrian timpuriu şi mijlociu 3 000—1 000	Fotosinteză şi aerobioză	Radiaţia solară, concentraţia crescîndă de O_2 atmosferic
Protoctista	Algele „superioare" eucariote (verzi, galbene-verzi, roşii şi brune); fungii şi protozoarele	Precambrian tîrziu? Paleozoic timpuriu 1 500—500	Mitoză şi meioză; recombinare obligatorie la fiecare generaţie; nutriţie mai eficientă	Sărăcirea în substanţe nutritive organice
Animalia	Metazoare: toate animalele care se dezvoltă de la zigot	Paleozoic 600	Dezvoltare de ţesuturi pentru specializări heterotrofe	Trecerea de la mediul acvatic la mediile aeriene şi terestru
Plantae	Metaphyta: toate plantele verzi superioare algelor verzi	Paleozoic 600	Dezvoltare de ţesuturi pentru specializări autotrofe	Trecerea de la mediile acvatice la mediile terestre

Scanned with OKEN Scanner

După Lamanna şi Mallette încadrarea bacteriilor în regnul vegetal este justificată de o serie de particularităţi morfologice şi mai ales fiziologice. În primul rînd, multe bacterii au capacităţi de sinteză similare acelora ale plantelor verzi care au un sistem metabolic autotrof, graţie căruia se hrănesc exclusiv cu substanţe anorganice. În mod asemănător, bacteriile autotrofe au proprietatea de a-şi elabora constituenţii celulari complecşi pornind de la substanţe foarte simple ca CO_2, NH_4, nitriţi, nitraţi şi mici cantităţi de săruri minerale. Pe de altă parte, în cazul bacteriilor heterotrofe care, asemenea unor plante inferioare ca ciupercile, au nevoie de substanţe organice pentru nutriţia lor, exigenţele faţă de caracterul acestor substanţe sînt de obicei mai puţin numeroase şi mai puţin imperioase decît în cazul animalelor.

Ca şi în organismul plantelor substanţele nutritive pătrund în corpul bacterian sub formă solubilă. În rarele cazuri în care bacteriile folosesc o hrană solidă, aceasta este iniţial hidrolizată şi solubilizată în mediul extracelular sub acţiunea unor enzime eliberate din corpul bacterian. Singura excepţie cunoscută este aceea a bacteriilor din genul *Thiobacillus*, care pot utiliza în metabolism sulful depus sub formă de granulaţii solide în interiorul celulei.

În contrast cu bacteriile şi cu celelalte plante, organismele animale au nevoie de substanţe organice complexe derivate din ţesuturile plantelor, ale altor animale, sau din diferitele secreţii ale acestora, şi au un tip de metabolism exclusiv heterotrof. În plus, animalele, chiar cele unicelulare, pot ingera substanţe nutritive sub formă de mase solide pe care le transformă prin procese de digestie în substanţe solubile mai puţin complexe, utilizate în nutriţia celulei sau a celulelor organismului respectiv. Pentru îndeplinirea funcţiei digestive, majoritatea animalelor dispun de un aparat digestiv morfologic diferenţiat, care este complet absent la bacterii şi la plante.

O altă particularitate prin care bacteriile se aseamănă cu plantele este aceea că ele, ca şi majoritatea organismelor vegetale, pierd apa şi substanţele hidrosolubile prin difuziune directă din interiorul celulei spre mediul extern, prin peretele celular. La animale, această funcţie este totdeauna îndeplinită de un aparat excretor specializat, care variază anatomic, de la simpla vacuolă contractilă a protozoarelor, pînă la complexele de organe diferenţiate ale animalelor superioare.

Multiplicarea bacteriilor se face prin diviziune binară de-a lungul axului transversal, pe cînd la celulele animale, cu cîteva excepţii, diviziunea se produce de-a lungul axului longitudinal.

În sfîrşit, o ultimă particularitate este aceea că majoritatea bacteriilor, între care toate aşa-zisele bacterii adevărate din ordinul *Eubacteriales*, au un perete celular rigid, morfologic diferenţiat, care învileşte la exterior citoplasma şi membrana citoplasmatică, aşa cum membrana celulozică învileşte celula vegetală. Citoplasma bacteriilor, ca şi aceea a celulelor vegetale, se poate retracta prin plasmoliză de la acest perete care îşi păstrează forma iniţială, datorită existenţei în compoziţia lui a unor polimeri similari glucidelor care-i conferă rigiditate.

Este de menţionat că există şi microorganisme — ca de exemplu *Mycoplasma* — considerate obişnuit ca bacterii, care au unele caracteristici comune celor două regnuri.

Scanned with OKEN Scanner

RICKETTSIILE

Rickettsiile formează un grup de *bacterii parazite obligatoriu intracelulare*, dintre care unele sînt patogene pentru om şi animale. Considerate iniţial ca un grup de microorganisme intermediare între bacterii şi virusuri, rickettsiile aparţin în mod evident lumii bacteriilor prin organizarea lor de tip celular şi structura internă a diferiţilor constituenţi, prin complexitatea compoziţiei chimice, prezenţa activităţilor metabolice, multiplicarea prin diviziune şi chiar prin natura parazitismului lor, deosebit de parazitismul absolut al virusurilor. Din punct de vedere filogenetic, se admite că rickettsiile au fost la origine paraziţi naturali ai artropodelor de la care au trecut la mamifere şi ulterior la om, prin intermediul vectorilor hematofagi. Acest punct de vedere pare justificat şi de faptul că, astăzi încă, rickettsiile se menţin în natură trecînd în mod obligatoriu în organismul unui artropod (insectă, căpuşă sau alt acarian) la care de multe ori se transmit ereditar.

Morfologie. Rickettsiile prezintă un polimorfism foarte accentuat, ele putînd apărea sub formă de coci mici izolaţi sau aşezaţi în perechi, sub formă de cocobacili, bacili sau chiar de filamente subţiri şi flexuoase, variabile ca lungime după specie şi condiţiile de cultivare.

Dimensiunile rickettsiilor variază între 0,2×0,3 şi 0,5 , putînd atinge sau chiar depăşi 1,5—2 μ în cazul formelor bacilare. Sînt imobile şi nesporulate.

Fig. 218. *Coxiella burnetii* — microelectronografie (după Bolton).

Scanned with OKEN Scanner

Se colorează relativ greu cu coloranţii de anilină, exceptînd cazul în care se folosesc mordanţi sau soluţii de colorant în tampon fosfat *p*H 7,4. Sînt Gram-negative.

Structura internă. Celula rickettsiană este delimitată de un perete celular alcătuit din 5 straturi concentrice şi dintr-o membrană citoplasmatică trilamelară. Suprafaţa externă a peretelui celular este acoperită la cele mai multe specii de un strat subţire, microcapsula, care are tendinţa să se desprindă uşor, sub forma unor fragmente submicroscopice (antigenul solubil). În citoplasmă se găseşte materialul nuclear, alcătuit din ADN, şi diferite structuri cu aspect granular (probabil ribosomi) vacuole şi unele particule electronoopace a căror semnificaţie biologică nu este clarificată.

Compoziţie chimică. Rickettsiile sînt alcătuite, ca toate bacteriile, din proteine, glucide, acizi nucleici (ADN în materialul nuclear şi diferitele tipuri de ARN în citoplasmă), unele vitamine şi săruri minerale, în proporţii care de asemenea pledează pentru apartenenţa lor la lumea bacteriană. Cromozomul rickettsiilor este alcătuit dintr-o cantitate relativ mică de ADN în raport cu cel al *E. coli* (10—20%), ceea ce reprezintă aproximativ 200—400 de gene (Watson). Peretele celular conţine acid muramic şi acid diaminopimelic, componente caracteristice ale peretelui celular bacterian.

Metabolism. Rickettsiile sînt organisme capabile de activitate metabolică independentă, deoarece au în echipamentul lor enzimatic, enzimele necesare atît pentru producerea de energie cît şi pentru activitatea biosintetică. Este probabil că parazitismul lor obligatoriu intracelular este condiţionat de marea lor sensibilitate la condiţiile variabile ale mediului şi în special la modificările de presiune osmotică. Celula-gazdă le oferă, pe lîngă materialul de construcţie necesar pentru biosinteză, şi protecţia faţă de influenţele defavorabile ale mediului. Ca urmare, ele nu pot fi cultivate decît în prezenţa celulelor vii

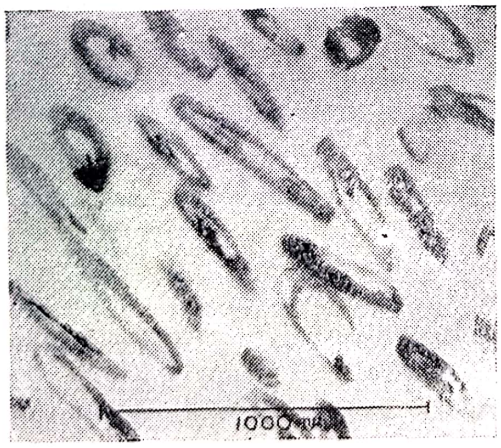


Fig. 219. *Coxiella burnetii* — microelectronografie evidenţiind structura internă, similară aceleia a celulelor bacteriene în general (după Anacker).

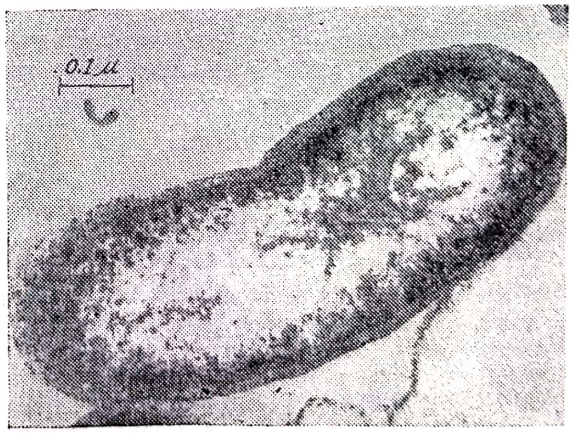


Fig. 220. Structura internă a rickettsiilor (după Stoker).

Scanned with OKEN Scanner

sau care sînt doar pe cale de a deveni metabolic inactive. Rickettsiile se cultivă în aerobioză, în sacul vitelin al embrionului de găină în curs de dezvoltare, precum şi în culturi de celule şi de ţesuturi. Ele au capacitatea de a produce infecţii uneori mortale la animalele de laborator (şoarece, şobolan alb, cobai), putînd fi obţinute în cantităţi mari din sînge sau din diferite organe (splină, glande suprarenale, creier, ficat etc.) ale animalului infectat.

Poziţie sistematică. Rickettsiile formează, după B e r g e y, ordinul *Rickettsiales* din clasa *Microtatobiotes* (*microtatus*=cel mai mic, *biote*=viaţă), *phylum Protophyta*. Denumirea de *Rickettsia* a fost dată în amintirea cercetătorului R i c k e t t s, care a murit în urma unei infecţii căpătate în timpul cercetărilor sale asupra febrelor exantematice. Un număr mic dintre speciile descrise — aproximativ 11 — formează grupul rickettsiilor patogene care, în afară de diferite artropode hematofage ca păduchele de corp (*Pediculus humanus* var. *corporis*), puricele de şobolan (*Xenopsylla cheopis*), căpuşele (*Ornithodorus* sp., *Rhipicephalus* sp., *Dermacentor* sp. ş.a.), parazitează intracelular o serie de mamifere domestice şi sălbatice şi chiar pe om, la care produc infecţii specifice cunoscute sub denumirea de rickettsioze.

Importanţa practică. Rickettsiile umane sînt boli febrile, în general cu exantem, care pot da uneori o mortalitate foarte mare (mergînd pînă la 95% dintre bolnavi). Printre cele mai importante sînt tifosul exantematic, tifosul murin (de şobolan), febra Q (tifosul pulmonar) etc. Agenţii lor patogeni sînt transmişi la om prin intermediul artropodelor vectoare.

Relaţiile dintre rickettsiile patogene şi artropode depind de gradul lor de adaptare determinat filogenetic. Astfel, infecţia păduchelui cu *Rickettsia prowazeki* (agentul patogen al tifosului exantematic) are efect letal pentru insectă, în timp ce prezenţa *R. mooseri* (agentul tifosului murin) este tolerată de purice. În alte cazuri, adaptarea rickettsiilor este atît de perfectă încît, de exemplu la căpuşe, ele depăşesc limitele obişnuite de localizare (tubul digestiv al artropodelor) şi, fără a le afecta în vreun fel, le invadează corpul, multiplicîndu-se în diferite organe şi ţesuturi şi, în plus, transmiţîndu-se ereditar la generaţiile următoare.

Restul de peste 40 de specii de rickettsii identificate pînă în prezent sînt nepatogene pentru mamifere şi sînt întîlnite numai la artropode, la care joacă în special rolul de simbionţi.

MICOPLASMELE

Micoplasmele reprezintă un grup de microorganisme importante nu numai prin anumite particularităţi privind dimensiunile, morfologia şi patogenitatea lor, ci mai ales prin ansamblul caracteristicilor generale care impun clasificarea lor drept cele mai mici organisme vii capabile să crească pe medii acelulare. Ele sînt deci cele mai mici entităţi celulare dotate cu activitate biochimică, funcţională şi de reproducere independentă, deoarece realizează biosinteza substanţei proprii prin asimilarea directă a substanţelor nutritive din mediul extern şi nu prin intermediul metabolismului unei celule-gazdă.

Istoric. Acţiunea patogenă a unei micoplasme a fost recunoscută de Pasteur în legătură cu boala numită *pleuropneumonia* bovideelor, dar acest agent patogen (*PPO* — în limba engleză = *pleuro-pneumonia organism*) nu a putut fi văzut şi nici cultivat decît în 1890 de Nocard şi Roux. Ulterior, el a fost considerat, pînă în ultimii ani, ca un virus aparte deşi, spre deosebire de virusuri, el se multiplică pe medii acelulare.

În 1941 s-a recunoscut existenţa în natură a acestei categorii noi de microorganisme parazite sau saprofite, cu proprietăţi neobişnuite care le deosebesc de virusuri, rickettsii şi bacterii. Prin analogie cu agentul *PPO*, organismele similare au fost numite *PPLO* (*pleuropneumonia like organisms* = organisme asemănătoare cu *PPO*).

Habitat. Micoplasmele sînt larg răspîndite în natură, fiind izolate din sol, apă de canal şi substanţe organice în descompunere. Unele specii patogene au fost izolate de la om, păsări, animale de laborator, vaci, cai, porci, oi, capre, cîini, pisici etc. şi, recent, de la plante.

Anatomie. Morfologia micoplasmelor, ca şi modul lor de creştere şi multiplicare fac încă obiectul unor discuţii contradictorii, deoarece plasticitatea extrem de mare a acestor organisme, caracterizate printr-un pleomorfism foarte accentuat, a permis interpretări divergente ale datelor de observaţie. Datorită lipsei unui perete celular rigid şi elasticităţii membranei citoplasmice, forma micoplasmelor poate fi extrem de variabilă. În aceeaşi cultură de *Mycoplasma gallisepticum*, spre exemplu, pot apărea forme sferoidale, hexagonale, helicoidale sau cu apendice „caudale" mai mult sau mai puţin lungi, astfel că şi mărimea lor poate oscila în limite extrem de largi, ca de exemplu, de la 90 mμ la 1 000 mμ. Se admite totuşi că, în cursul creşterii, micoplasmele suferă un ciclu de modificări morfologice avînd ca punct de plecare o formaţiune foarte mică, denumită *corp elementar* sau *unitate minimă de reproducere*,

Scanned with OKEN Scanner

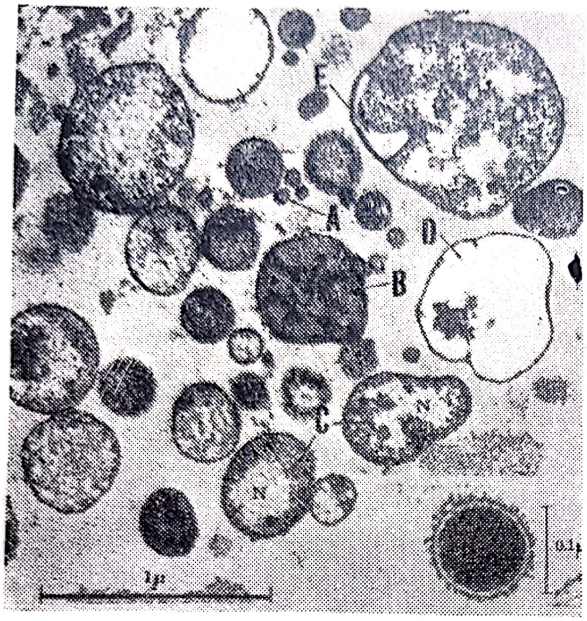


Fig. 221. Diferite tipuri morfologice de *Mycoplasma hominis:*

A — corp elementar; *B* — forme mari cu protoplasma granulară; *C* — forme cu materialul nuclear *(N)* bine diferenţiat de citoplasmă *(C)*; *D* — celulă aparent golită de conţinut; *E* — celulă cu vacuolă periferică. Dreapta jos — ultrastructura unui corp elementar (după Anderson).

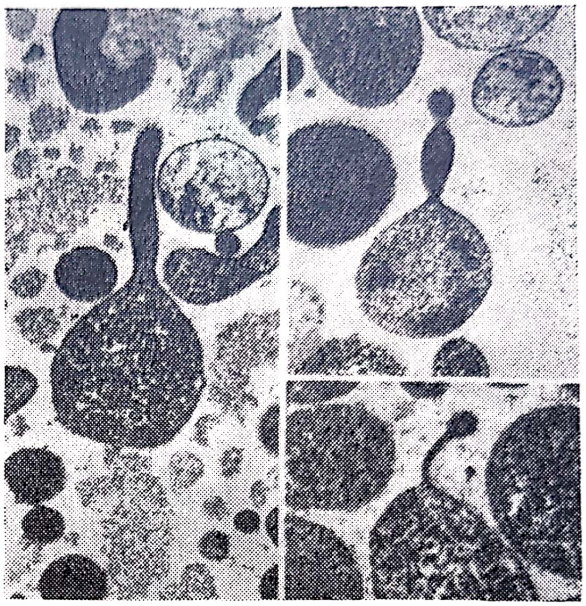


Fig. 222. *Mycoplasma hominis:* celule cu diferite tipuri de prelungiri filamentoase (după Anderson).

care are o formă sferică şi un diametru cuprins între 125 şi 250 mμ (mai mic decît al rickettsiilor şi chiar al virusurilor mari). Corpii elementari sînt Gram-negativi. Ei trec prin filtrele bacteriologice datorită unei deosebite plasticităţi permiţînd aspirarea lor mecanică prin pori, care, în mod normal, reţin celule cu o mărime egală.

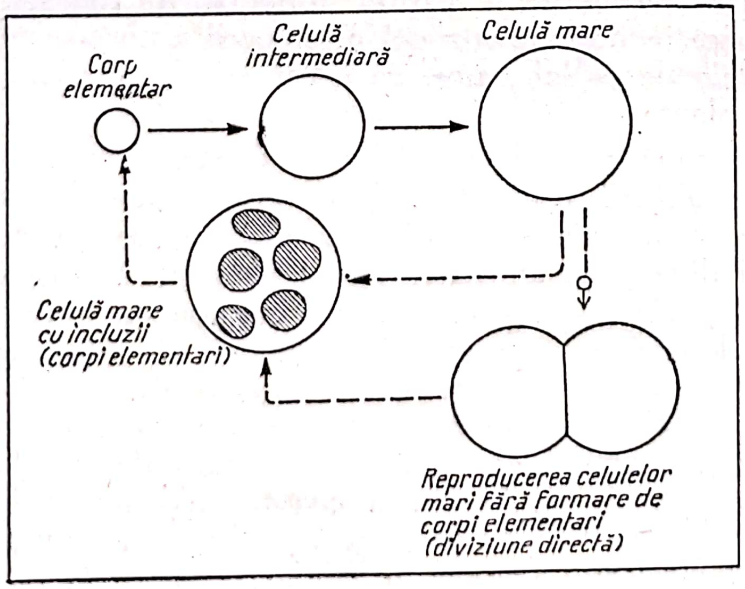


Fig. 223. Ciclul deîviaţă la *Mycoplasma laidlawii.* Corpii elementari cresc spre stadiul de celulă intermediară şi apoi spre cel de celule mari care se pot reproduce prin diviziune directă (fără formare de corpi elementari — sau prin formarea de incluzii care sînt liberate sub forma de corpi elementari) (după Morowitz).

După Freundt micoplasmele în general ar creşte sub formă de structuri miceliale, în sensul că unitatea minimă de reproducere ar putea forma un filament foarte fin, la capătul căruia s-ar constitui un corp sferic terminal, capabil, la rîndul său, să formeze noi filamente şi să dea naştere la structuri ramificate. După Klieneberger-Nobel şi Dienes, stadiul filamentos ar fi propriu numai unor specii (*M. mycoides*), în celelalte cazuri fiind vorba de artefacte datorită faptului că, lipsite de perete celular, micoplasmele sînt structuri foarte plastice, capabile să sufere deformări ca răspuns la şocul osmotic şi la diferite forţe fizice externe. Studiul lor electronooptic a permis evidenţierea următoarelor structuri:

— *Membrana plasmatică* — singura structură membranoasă a celulei — care are o grosime de circa 100 Å (ca şi membrana celulelor animale) şi este alcătuită din trei straturi suprapuse alcătuite din proteine şi lipide. Straturile intern şi extern sînt mai opace la electroni, în timp ce stratul mijlociu este cu mult mai puţin dens. Membrana are o structură elastică, ceea ce permite micoplasmelor să ia forme variate, dar este suficient de rezistentă pentru a separa celula de mediul înconjurător şi pentru a menţine în interiorul ei conţinutul celular. Prin această din urmă proprietate, ea îndeplineşte în parte şi rolul protector al peretelui celular rigid, care la aceste organisme lipseşte.

Materialul nuclear — alcătuit din ADN — care ocupă o zonă compactă, în general centrală, similară aceleia caracteristice bacteriilor.

Ribosomii, care pot fi văzuţi izolaţi sau cel mai frecvent în aranjamente geometrice cu aspect cilindric, probabil analoge funcţional polisomilor, dar cu o structură mult mai complicată, determinată probabil de aşezarea helicală a aproximativ 50 de elemente.

Compoziţie chimică. În afară de proteine, care reprezintă ponderal componentul lor major, micoplasmele mai conţin glucide (0,1—10%), lipide (10—20%), ADN (4%) şi ARN (8%). Nu există date privind conţinutul lor în substanţe minerale. Au fost puse în evidenţă circa 40 de funcţii enzimatice, între care întreg sistemul enzimatic necesar pentru metabolismul glucozei la acid piruvic, prin care celulele obţin energia din substanţele nutritive.

Metabolism. Micoplasmele se dezvoltă pe medii de cultură artificiale, îmbogăţite cu substanţe proteice complexe de origine animală (lichid de ascită, ser sanguin, sînge, extract de ficat) şi, în mod obligatoriu, cu colesterol.

Nevoia de colesterol întîlnită şi la protozoare, este o particularitate foarte interesantă a micoplasmelor, întrucît ea este absentă la bacterii. Colesterolul ar participa la formarea stratului intermediar de natură lipidică al membranei plasmatice şi ar interveni în transportul diferitelor substanţe nutritive şi produşi finali prin membrana celulară. Cultivarea micoplasmelor se face cel mai bine în atmosferă de N şi 5—10% CO_2 şi, în general, numai slab în aerobioză. Coloniile pe agar, de dimensiuni foarte mici (10—20μ—600μ), cresc lent (uneori în 6—20 de zile) şi au un aspect caracteristic de „ouă ochiuri".

Reproducere şi ciclu de viaţă. Cercetările efectuate pe *M. laidlawii* au permis punerea în evidenţă a unui ciclu de viaţă avînd ca punct de plecare corpii elementari cu aspectul lor caracteristic de sferă mică (Φ 100—200 mμ).

Aceştia cresc treptat, ajungînd la stadiul de celule intermediare, care, la rîndul lor, cresc în continuare devenind celule mari (Φ 1 000 mμ) cu formă de disc sau neregulată. Ajunse în acest stadiu, celulele mari pot evolua pe două căi diferite. Una dintre ele corespunde apariţiei în interiorul unei celule mari a unui număr variabil (în general proporţional cu mărimea celulei) de incluzii, care după ce se liberează din celula-mamă se transformă în corpi elementari sau unităţi minime de reproducere, care reiau ciclul de evoluţie. Cea de-a doua cale corespunde cazului în care celulele mari se scindează prin diviziune binară (simplă), după care cel puţin unele dintre celulele-fiice formează şi liberează noi corpi elementari.

Taxonomie. Micoplasmele formează un ordin *(Mycoplasmatales)* din clasa *Schizomycetes* (B e r g e y), alcătuit din circa 20 de specii. Unele specii sînt patogene pentru om, provocînd infecţii respiratorii, artrite, encefalite, leziuni mamare, oculare sau ale căilor genitourinare. *M. pneumoniae* sau *agentul lui Eaton* produce pneumonia atipică primară umană. Alte specii sînt patogene pentru animale *(M. agalactiae, M. mycoides, M. gallisepticum)*, sau pentru plante, iar altele sînt totdeauna saprofite *(M. laidlawii)*.

Probleme de biologie generală legate de studiul micoplasmelor. Deşi mai mici decît multe virusuri (Φ 125 mμ—150 mμ), micoplasmele au capacitatea de a prelua diferite substanţe din mediul înconjurător neanimat şi de a le folosi în metabolism, pentru biosinteza constituenţilor lor celulari necesari creşterii şi multiplicării. Ele reprezintă astăzi cele mai mici organisme capabile să ducă o viaţă independentă. Ca mărime, micoplasmele reprezintă 1 : 10 din mărimea medie a bacteriilor, 1 : 100 din mărimea celulelor animale (mamifere) şi 1 : 1 000 din aceea a unei amoebe. Ca urmare, sub raportul dimensiunilor liniare o celulă PPLO este de 1 000 de ori mai mare decît un atom de H (1 Å) şi de 1 000 ori mai mică decît o amoebă. Diferenţa este mai semnificativă în raport cu masa celulară, reprezentată pentru o celulă de PPLO prin 5×10^{-16} g, iar pentru un protozoar de 5×10^{-6} g.

Se pune problema dacă există celule microbiene mai mici decît microplasmele, încă nedescoperite astăzi dar capabile de creştere şi multiplicare pe medii acelulare. Teoretic, pe baza unor considerente de ordin biologic şi biochimic, limita inferioară de mărime a unei celule este determinată de posibilitatea ei de a conţine toţi constituenţii care îi sînt necesari pentru creşterea în mediul extern. Ca atare, orice celulă trebuie să aibă o membrană capabilă să menţină integritatea organizării ei structurale, asigurînd în acelaşi timp funcţia de permeabilitate selectivă, să conţină materialul genetic indispensabil pentru codificarea sintezei constituenţilor ei celulari şi să dispună de un aparat propriu de sinteză a proteinelor, ca şi de enzimele necesare pentru biosinteză şi obţinerea de energie intracelulară. Conform acestor criterii, cel mai mic organism teoretic posibil ar trebui să îndeplinească cel puţin 100 de reacţii enzimatice. Considerînd că fiecare reacţie ar fi determinată de o singură enzimă, celula ar trebui să aibă o formă sferică şi Φ 400 Å pentru a putea include enzimele şi substratele lor. Legat de aceasta, este de menţionat că studiile asupra ADN cu gr. mol. totală $4{,}5 \times 10^7$ din micoplasme sugerează că informaţia codificată în el este cantitativ adecvată pentru a dirija sinteza a circa 45 de enzime,

ceea ce reprezintă o cifră mult inferioară celei socotite ca absolut necesară pentru funcţia unei celule. Aceste date permit ipoteza că enzimele celulelor foarte mici ar fi mai puţin specifice în acţiunea lor şi deci mai „adaptabile", putînd îndeplini un număr mai mare de activităţi. În sfîrşit, după considerente de ordin biofizic (Schrödinger), diametrul minim posibil al unei celule vii este de circa 500 Å, ceea ce ar corespunde la un conţinut de aproximativ 150 de macromolecule (respectiv 75 000 monomeri şi 1 500 000 atomi). O astfel de celulă pur teoretică ar fi extrem de fragilă, deoarece capacitatea ei de reproducere ar putea fi totdeauna ameninţată de mişcarea termică întîmplătoare a moleculelor sale constitutive. Menţionăm că în raport cu această celulă ipotetică — teoretic cea mai mică posibilă — un corp elementar PPLO are ϕ de 1 000 Å, circa 1 200 de macromolecule şi 12 milioane atomi, iar o celulă PPLO mare are ϕ de 2 500 Å, 18 750 de macromolecule şi 187 milioane atomi.

FORMELE „L"

Formele „L" ale bacteriilor, numite astfel după iniţiala Institutului „Lister" în care s-a făcut prima observaţie, au fost descoperite de Klieneberger-Nobel (1935) la *Streptobacillus monilliformis*, fiind considerate la început ca entităţi biologice independente, provenite dintr-o contaminare exogenă. Ulterior, asemenea forme au fost descrise şi la alte bacterii (*Proteus vulgaris, Escherichia coli, Haemophilus influenzae, Salmonella, Shigella, Bacillus, Clostridium, Neisseria, Flavobacterium* sp., streptococ, stafilococ, sporulaţi aerobi şi anaerobi etc.) şi au fost interpretate ca reprezentînd o fază evolutivă în ciclul de dezvoltare a bacteriei.

Studiul acestor forme a arătat că ele sînt în realitate o formă de creştere a *Eubacteriilor*. Caracterizate prin absenţa peretelui celular, aspecte morfologice şi caractere de cultură particulare, ele au o mare sensibilitate la variaţiile de presiune osmotică, dar pot supravieţui şi se pot dezvolta dacă mediul este echilibrat din punct de vedere osmotic.

Experimental, apariţia formelor „L" poate fi indusă în mediul de cultură prin adăugarea unor concentraţii mici de penicilină, care inhibă încorporarea în peretele celular a substanţelor care alcătuiesc mucocomplexul răspunzător de rigiditatea peretelui celular bacterian. În geneza acestor forme au mai fost încriminaţi diferiţi alţi factori nefavorabili din mediu, cum ar fi bacteriofagii, radiaţiile, anumite substanţe chimice, anticorpii specifici etc.

Formele „L" au o serie de particularităţi care le deosebesc de celula din care provin. Astfel, Tulasne a descris un ciclu de evoluţie cu mai multe căi alternative, în raport cu care formele „L" pot avea o formă sferică şi dimensiuni foarte mici, de 125—250 mμ (forme pitice) sau aspectul unor corpi globuloşi de 5—10μ. Ele nu se colorează cu coloranţii obişnuiţi. Foarte fragile osmotic, formele „L" sînt în schimb rezistente la antibiotice, în special la penicilină. Ele au exigenţe nutritive speciale şi cresc foarte încet. În cazul cînd derivă din bacterii patogene, aceste forme au în general o patogenitate redusă.

Formele „L" ale bacteriilor au multe trăsături comune cu micoplasmele care ar putea fi considerate ca forme „L" apărute spontan în natură din celule de Eubacterii, sub acţiunea unor condiţii fiziologice speciale sau ca rezultat al unei mutaţii comportînd pierderea capacităţii de sinteză a unor constituenţi

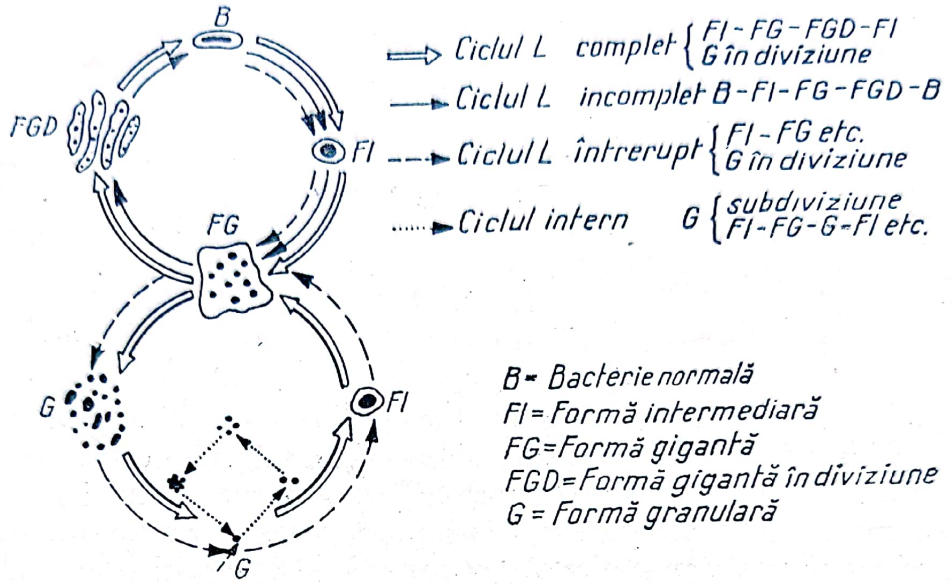


Fig. 224. Formele „L" ale bacteriilor. Diferitele cicluri de evoluţie posibile.

parietali. Suprimarea factorilor de mediu inductori sau adăugarea de constituenţi ai peretelui celular permit reversia mutantelor la tipul celular normal.

În acord cu această concepţie, genul *Mycoplasma* ar deriva din diferite alte grupe de bacterii, ca urmare a unor deficienţe metabolice survenind în medii naturale care au permis formelor derivate să supravieţuiască în ciuda faptului că sînt lipsite de perete celular.

ACTINOMICETELE

Actinomicetele sînt considerate ca *bacterii Gram-pozitive tranzitoriu sau constant filamentoase şi ramificate,* deci eubacterii miceliene, caracterizate printr-o mare varietate de tipuri morfologice. Datorită faptului că au unele asemănări morfologice izbitoare cu fungii, de exemplu particularitatea de a forma hife ramificate, actinomicetele au fost considerate iniţial, în mod eronat, ca făcînd parte din categoria acestor organisme.

Habitat. Cele mai multe actinomicete sînt saprofite în sol, atît la suprafaţa cît şi în profunzimea lui. Ele sînt frecvente în solurile uscate, alcaline, arate şi, în genere, în orice sol bogat în substanţe organice. Actinomicetele se dezvoltă şi pe resturile vegetale, pe plante, în bălegar (unele specii termofile), în apele lacurilor şi în nămol. Unele specii sînt parazite ale plantelor, omului şi animalelor.

Morfologie. Actinomicetele sînt microorganisme de formă alungită, filamentoasă, cu o tendinţă marcată de ramificare, de unde aspectul lor de miceliu. Filamentele miceliene sau hifele sînt în mod obişnuit foarte subţiri, cu diametrul de 0,5—0,8 μ pînă la maximum 1,5 μ. Pe medii artificiale de cultură, în interiorul hifelor, nu se formează septuri transversale, filamentul micelian fiind format în acest caz, ca şi la unele ciuperci, dintr-o singură celulă. Actinomicetele sînt în general microorganisme sporogene şi imobile.

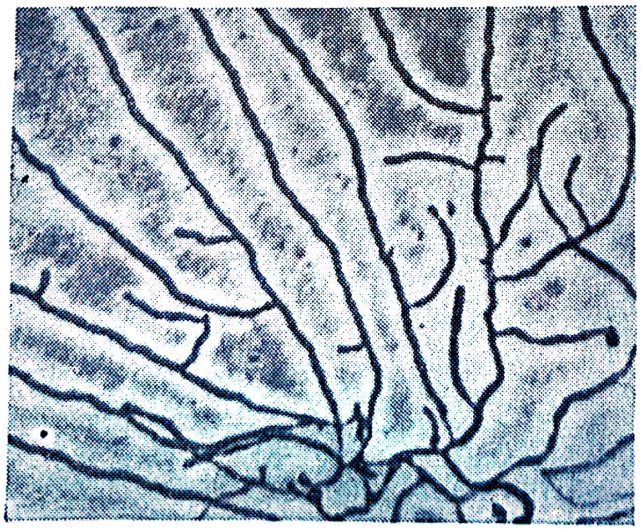


Fig. 225. Miceliul unui actinomicet (după Hopwood).

Scanned with OKEN Scanner

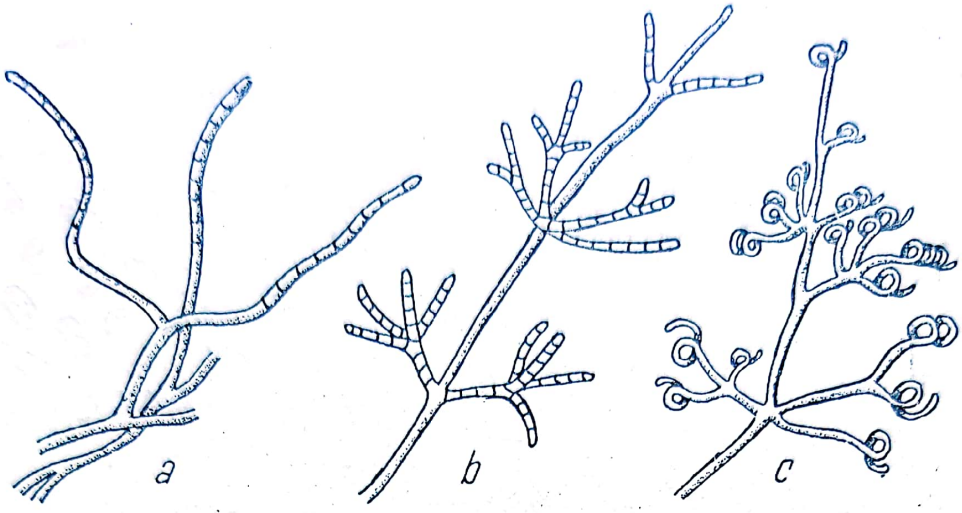


Fig. 226. Aspectul sporoforilor la actinomicete:
a — Actinomyces longisporus rubrus; b — A. glaucus; c — A. verticillatus
(după Krasilnikov).

Unele specii sînt acidorezistente. Celulele tinere au un aspect omogen şi refringent, pe cînd cele bătrîne conţin vacuole, picături de grăsime şi granule metacromatice, formate dintr-o substanţă de rezervă — metacromatina. Ca în orice celulă de tip procariot, materialul nuclear este reprezentat în celulele vegetative de un număr variabil de nucleoizi, iar în spori de un nucleoid unic. La speciile cu miceliu aerian, pe filamentele acestuia se formează ramificaţii specializate, numite *sporofori*, de formă dreaptă, incurbată sau spiralată. Sporoforii nespiralaţi pot fi lungi şi uşor incurbaţi, sau scurţi şi drepţi ca nişte ţepi; cei spiralaţi pot avea 1—10 spire sau chiar mai multe, care pot fi laxe sau, dimpotrivă, comprimate. Sporoforii sînt dispuşi fie izolat, fie în grupuri — uneori caracteristice — de exemplu în panicule.

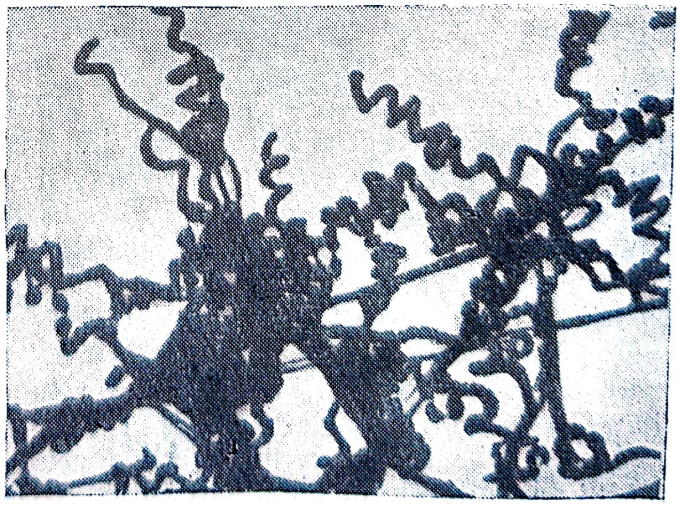


Fig. 227. Miceliu aerian de *Streptomyces* cu sporofori spiralaţi (după Mach).

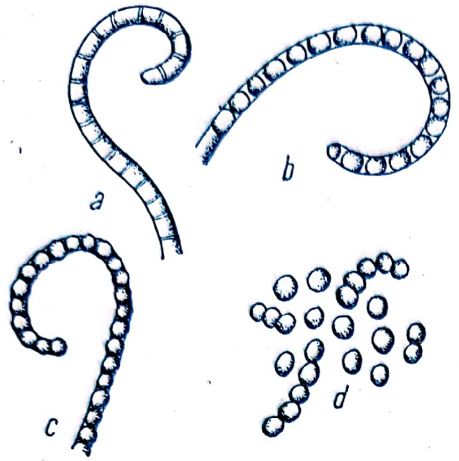


Fig. 228. Formarea sporilor prin fragmentare la *Actinomyces coelicolor:*

a — diviziunea citoplasmei; *b* — condensarea ei în formaţii sferice; *c* — formarea şi maturarea sporilor.

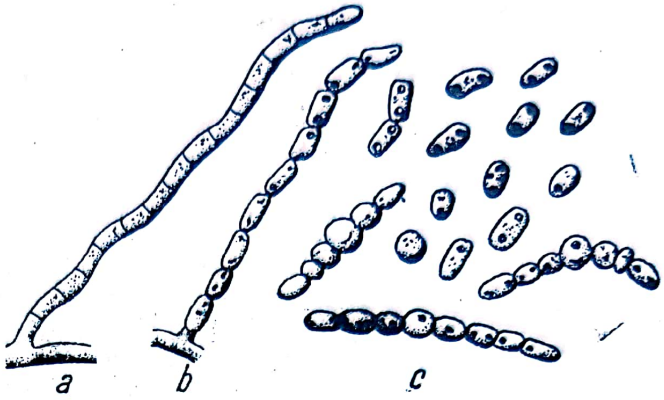


Fig. 229. Formarea sporilor prin segmentare la *A. oidiosporus:*

a — formarea septurilor transversale; *b* — segmentarea filamentului la nivelul septurilor transversale; *c* — spori maturi izolaţi sau în lanţuri (după Krasilnikov).

Multiplicare şi sporogeneză. În anumite stadii de dezvoltare a miceliului, la extremităţile ramificaţiilor sporogene se formează, prin fragmentarea sporoforului sau prin segmentarea sa internă în mai multe celule, spori sferici, ovalari sau cilindrici cu extremităţile secţionate drept.

— *Sporularea prin fragmentare* se produce prin condensarea protoplasmei sporoforului în formaţii rotunjite, urmată de îmbrăcarea acestor formaţii în membrane proprii şi de transformarea lor în spori maturi, sferici, care sînt puşi în libertate prin distrugerea membranei sporoforului.

— *Sporularea prin segmentare* se realizează prin formarea unor septuri transversale care segmentează filamentul micelian, după care fiecare dintre celulele astfel rezultate se transformă într-un spor alungit.

După natura şi modul lor de formare, se deosebesc cu precădere trei tipuri de spori la actinomicete: *1) oidiospori*, care iau naştere prin fragmentarea sau diviziunea transversală a hifelor, după un mecanism similar aceluia prin care se formează oidiile la fungii adevăraţi; *2) conidii*, care apar izolat la extremitatea unor conidiofori simpli sau ramificaţi şi *3) sporangiosporii*, care se formează în sporangi sferici sau de alte forme. Cînd sporul cade pe un mediu favorabil, membrana sporală se lizează şi, din interiorul lui, se dezvoltă una sau mai multe excrescenţe care se alungesc treptat şi se ramifică, dînd naştere unui nou miceliu vegetativ. La unele specii, în interiorul unui filament micelian se formează, ca şi la ciuperci, un al patrulea tip de spori — *chlamidosporii* — de formă ovală, cu membrană groasă bine vizibilă la microscop şi puţin mai mari decît diametrul transvers al filamentului unde au apărut şi care, de aceea, apare umflat din loc în loc. O dată ajunşi pe un mediu nutritiv şi aceşti spori germinează şi dau naştere unui nou miceliu.

În culturile foarte vechi, miceliile actinomicetelor se desfac uşor în fragmente de diferite lungimi, cu aspect necaracteristic, care se formează fără

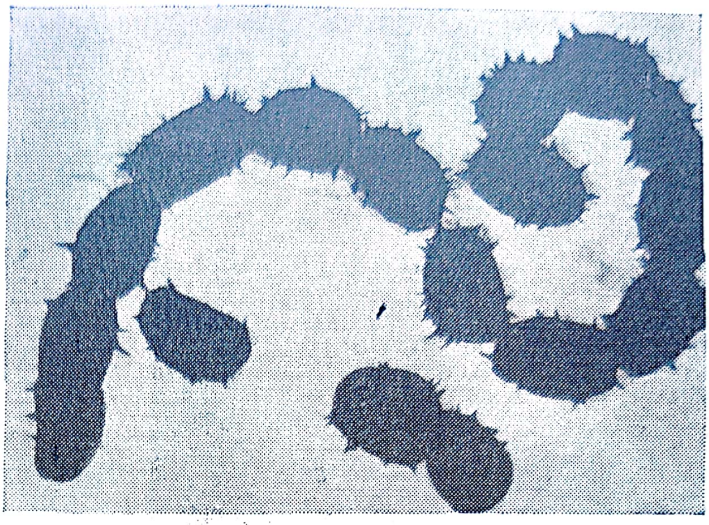


Fig. 230. *Streptomyces* sp. Lanț de conidii avînd pe suprafața lor formațiuni cu aspect de ghimpi (după Mach).

intervenția unor septuri transversale. Uneori, miceliile se dezagregă într-o masă fină granulară, ca urmare a distrugerii membranei filamentului. Porțiunile de miceliu separate în acest fel pot forma un miceliu nou, atunci cînd ajung din nou pe un substrat nutritiv proaspăt. Speciile asporogene se multiplică, asemenea bacteriilor, prin diviziune directă, proces care se poate întîlni și la specii sporogene.

Metabolism. O particularitate a fiziologiei actinomicetelor o constituie modul lor de nutriție omnivor, care le permite să se dezvolte pe substraturi organice dintre cele mai diferite.

În condiții naturale — pe resturile vegetale — actinomicetele încep să se dezvolte după ce bacteriile și ciupercile au încetat să se mai multiplice, atunci cînd toate substanțele ușor asimilabile din resturile vegetale au fost descompuse și asimilate de predecesorii lor. Actinomicetele cresc bine și pe mediile de cultură uzuale, neavînd nevoi speciale de substanțe nutritive. Ele folosesc azotul în stare, atît minerală, cît și organică, iar carbonul sub formă de acizi organici, dextrine și amidon. Unele specii descompun substanțele grase, parafinele, fenolii, lignina, taninurile sau cauciucul. Capacitatea lor de a degrada substanțele organice dintre cele mai complexe le conferă un rol important în natură, în special în descompunerea substanțelor organice din nămoluri și din sol.

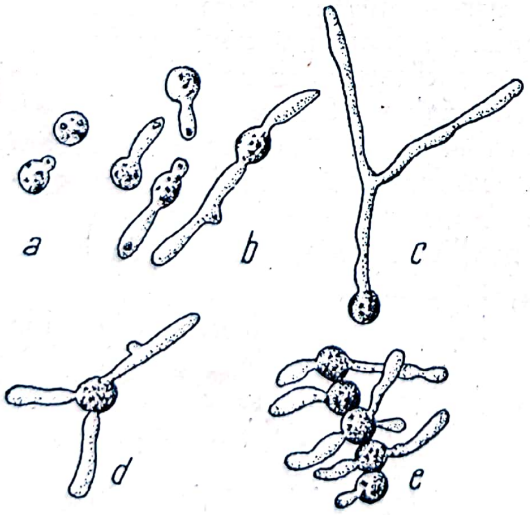


Fig. 231. Germinarea sporilor la actinomicete:
a — stadiul inițial; *b*, *c*, *d* — formarea tubului de germinație; *e* — creșterea ulterioară în formă de filament și ramificarea (după Krasilnikov).

Pe mediile de cultură artificiale, aceste microorganisme sintetizează diferite substanțe din grupul vitaminelor

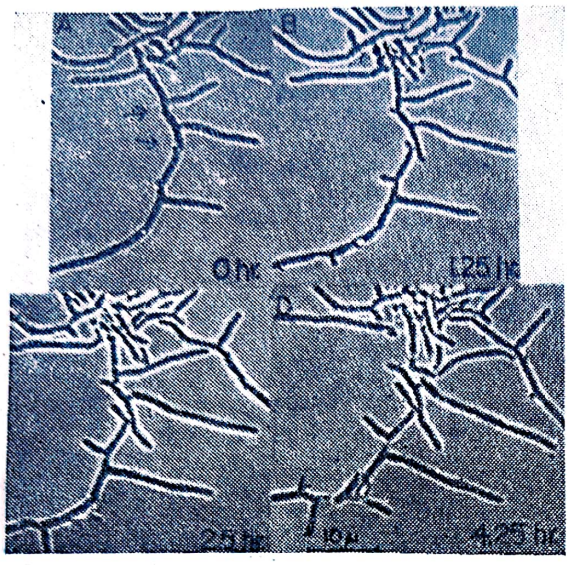


Fig. 232. Stadii succesive în creşterea unui actinomicet (*Nocardia* sp.). O mică porţiune din „miceliu" cuprinsă între două săgeţi *(A)* se desprinde şi creşte apoi independent *(B, C, D)* (după Robinow).

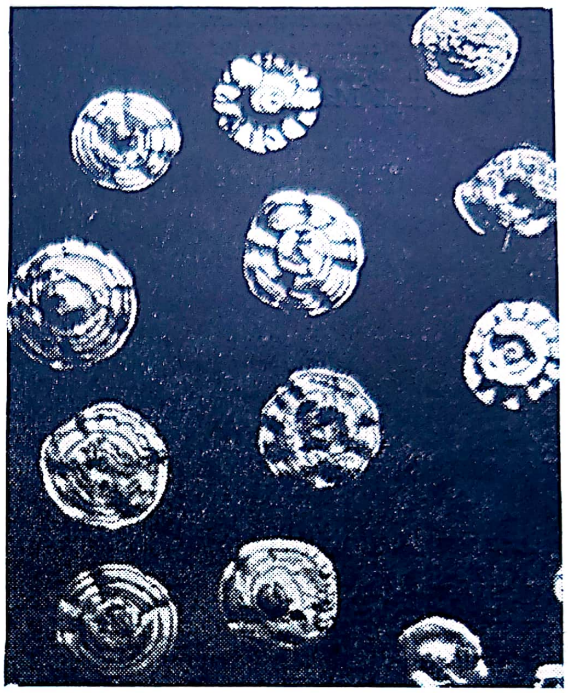


Fig. 233. Colonie de actinomicete pe mediu gelozat (după Kubec).

(B_1, B_2, B_6, biotină şi acizii folic, pantotenic şi nicotinic), auxine, aminoacizi, precum şi diferiţi compuşi care dau culturilor un miros caracteristic de pămînt, de camfor sau de fructe. Ele sînt cel mai adesea strict aerobe, dar pot fi şi microaerofile sau facultativ anaerobe.

Creştere. Cînd o hifă izolată se dezvoltă într-un mediu favorabil, ea creşte şi se alungeşte printr-una din extremităţile sale. Pe suprafaţa unui mediu solid hifele pot creşte prin ramificaţiile lor în toate direcţiile, formînd o *colonie* în jurul locului unde a fost depus miceliul de origine. Mărimea coloniei, apreciată prin distanţa dintre centrul şi marginea ei, creşte în funcţie de durata incubaţiei. În medii lichide agitate constant se formează colonii sferice, aşa-numitele „bule" de miceliu. Spre deosebire de bacteriile propriu-zise, actinomicetele cresc sub formă de colonii şi în mediile lichide, deoarece la aceste microorganisme singurele celule individuale sînt conidiile.

Taxonomie. Analizînd comparativ caracteristicile actinomicetelor, fungilor şi bacteriilor, unii autori consideră că actinomicetele reprezintă o linie filogenetică separată. Cei mai mulţi microbiologi sînt de părere că ele trebuie considerate ca eubacterii miceliene şi clasificate în clasa *Schizomycetes*.

Actinomicetele seamănă cu fungii prin trei caractere evidente, şi anume: *1*) formarea de hife ramificate; *2*) existenţa sporilor tipici de diseminare, cu funcţie specifică de multiplicare şi *3*) absenţa endosporilor de tip bacterian.

Cele mai multe şi mai importante particularităţi le diferenţiază însă de fungi şi pledează pentru apartenenţa lor la lumea bacteriilor. Astfel: *1*) organizarea celulară a actinomicetelor este, ca şi aceea a bacteriilor, de tip procariot;

material genetic reprezentat de nucleoid, perete celular mureinic, deci lipsit de celuloză sau chitină, flageli de tip bacterian la speciile mobile, absența mitocondriilor și a reticulului endoplasmic; 2) diametrul hifelor, structura și dimensiunile constituenților interni le diferențiază esențial de fungi; 3) prezintă unele forme strict anaerobe și forme cu nutriție de tip chimioautotrof, ceea ce nu se întîlnește niciodată la fungi; 4) sînt sensibile la acțiunea unor fagi — actinofagi — spre deosebire de fungi, care nu sînt accesibili parazitismului viral; 5) sînt sensibili la acțiunea antibioticelor care inhibă bacteriile Gram-pozitive și rezistente față de aceea a antibioticelor, strict antifungice (date noi arată că diferențele de sensibilitate la antibiotice au semnificație filogenetică).

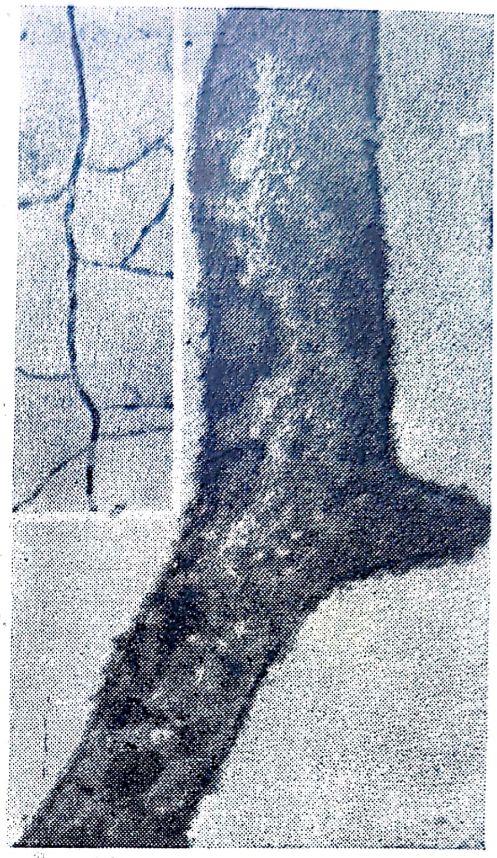


Fig. 234. *Streptomyces coelicolor.* Secțiune ultrafină evidențiind structura internă similară aceleia a bacteriilor, lipsită de diferențierea caracteristică microorganismelor miceliene eucariote (după Glauert).

În ceea ce privește clasificarea în interiorul grupului actinomicetelor nu există un acord unanim. Identificarea lor — spre deosebire de aceea a bacteriilor — se poate face relativ ușor după caracterele morfologice în cazul tulpinilor recent izolate din mediul natural. Morfologia tipică nu se menține însă în cazul cînd tulpinile sînt păstrate vreme îndelungată în laborator pe medii artificiale. După Bergey, actinomicetele alcătuiesc ordinul *Actinomycetales* cu patru familii: Fam. I *Mycobacteriaceae* — care include microorganisme cu miceliul rudimentar sau chiar nemiceliene, asporogene și conținînd lipide de tip special cu circa 80 de atomi de C (*acid micolic*); Fam. II. *Actinomycetaceae*; Fam. III. *Streptomycetaceae* și Fam. IV. *Actinoplanaceae*. Familiile II, III și IV au miceliul ramificat caracteristic și se multiplică prin intermediul unor spori de tip special (oidiospori, conidii sau sporangiospori) sau de tip mixt, rezultînd din combinații ale acestor trei tipuri de spori.

Principalii reprezentanți ai actinomicetelor: Mycobacterium este genul prin care se face legătura cu *Eubacteriales* (bacteriile adevărate, propriu-zise). Miceliul este rudimentar și tranzitoriu; el apare în culturile tinere la începutul dezvoltării lor, dar are tendința să se fragmenteze rapid, formînd celule bacilare nesporogene, ușor incurbate, asemănătoare bacteriilor tipice. Din acest gen fac parte bacterii patogene pentru om și animale (*Mycobacterium tuberculosis*, cu varietățile sale, agenții patogeni ai tuberculozei umane, bovine și aviare).

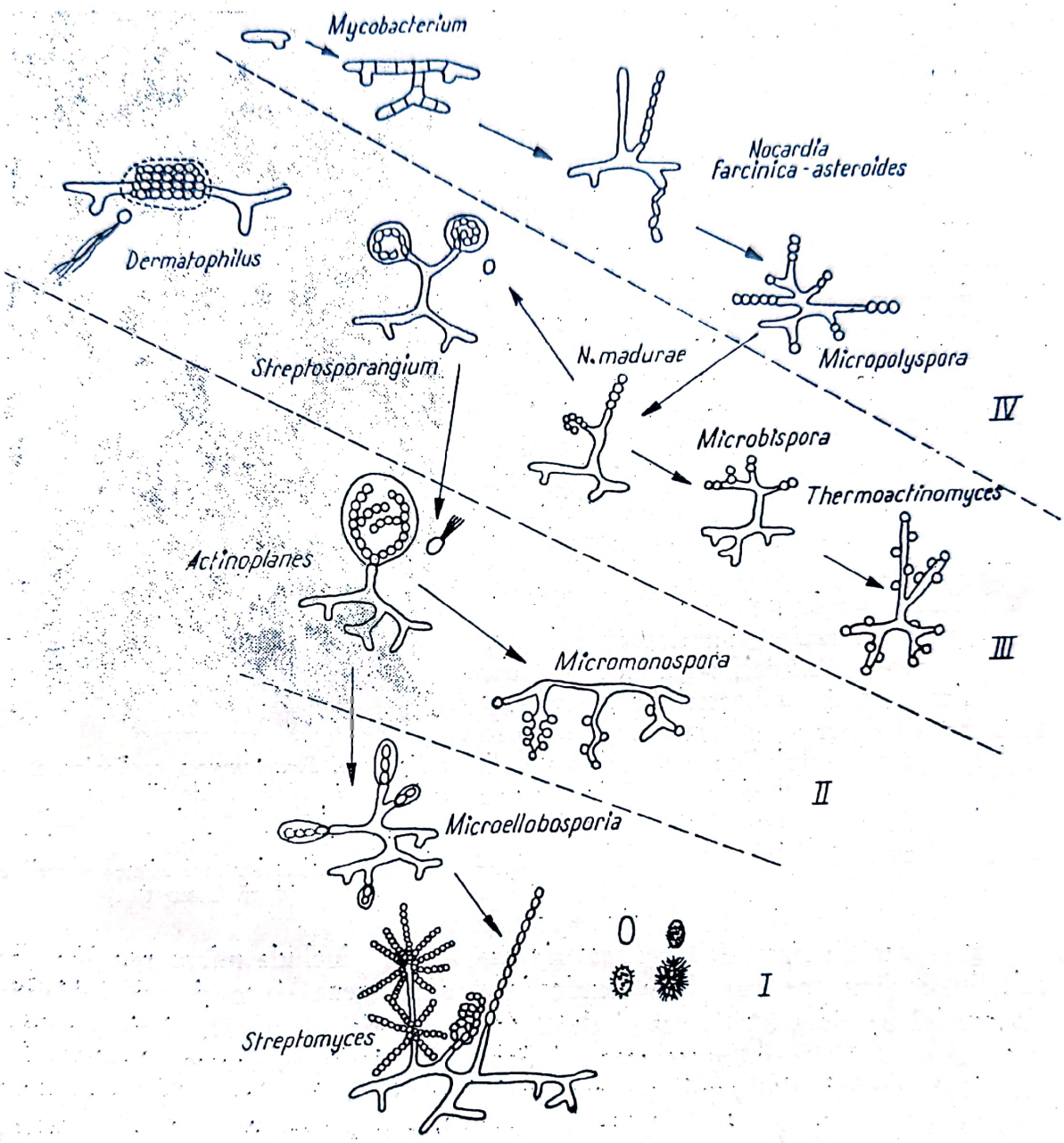


Fig. 235. Caracteristicile morfologice tipice (micelii şi spor) ale principalelor grupe de actinomicete aerobe. Gruparea lor în desen este făcută în funcţie de evoluţia lor filogenetică (după Lechevalier).

Genurile *Nocardia* (aerob) şi *Actinomyces* (anaerob) au structura aproape exclusiv miceliană, constînd din filamente neseptate, mai mult sau mai puţin ramificate. În culturile vechi, miceliul se fragmentează în celule bacilare sau cocoide care nu pot fi deosebite de cele bacteriene şi care se reproduc prin diviziune simplă.

Genurile *Streptomyces* şi *Micromonospora* au un miceliu dezvoltat la maximum şi cu caracter de structură permanentă. Aceste actinomicete se reproduc prin formarea la extremitatea hifelor a unor celule reproducătoare de tip special — *conidii* — reprezentînd spori diferiţi de omonimii lor de la fungi. Ca şi la fungi, creşterea miceliană şi reproducerea prin conidii pot fi considerate ca un rezultat al multiplicării naturale în sol (tab. 17).

TABELUL 17

CARACTERELE PRINCIPALELOR GENURI DE ACTINOMICETE

Genul	Formare de miceliu	Miceliu aerian	Reproducere	Respiraţie	Acido-rezistenţă
Mycobacterium	Tranzitorie şi moderată	—	Diviziune directă; absenţa sporului	Strict aerobă	+
Nocardia	Extensivă	—	Fragmentarea hifelor; diviziune directă	Strict aerobă	±
Actinomyces	Extensivă	—	Fragmentarea hifelor; diviziune directă	Anaerobă	—
Streptomyces	Extensivă	+	Conidii în lanţuri	Strict aerobă	—
Micromonospora	Extensivă	—	Conidii	Strict aerobă	—
Actinoplanes	Extensivă	—	Sporangiospori formaţi în sporange	?	—

+ = prezent.
— = absent.

Importanţa practică. În condiţii naturale, în sol, actinomicetele participă în mare măsură la procesele de degradare biologică şi mineralizare a substanţelor organice. Importanţa lor practică este legată de faptul că ele reprezintă, în general prin specii ale genului *Streptomyces*, cei mai activi producători de substanţe *antibiotice*. În sfîrşit, unele actinomicete produc la om şi la animale infecţii cu localizări variate (*Mycobacterium*), infecţii viscerale (*Actinomyces, Nocardia, Streptomyces* etc.), sau afecţiuni cutanate superficiale (*Dermatophilus, Micromonospora*). *Streptomyces scabies* este fitopatogen şi produce rîia comună a cartofului.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

CIUPERCI MICROSCOPICE

1. LEVURILE

Levurile sau *drojdiile* reprezintă un grup taxonomic eterogen de microorganisme din filumul *Eumycetes* (fungi adevărați), care se prezintă în mod obișnuit și dominant în formă unicelulară și au o organizare internă de tip eucariot. Ele se înmulțesc în mod obișnuit prin *înmugurire* și ocazional prin *diviziune simplă* sau prin *procese sexuale* în urma cărora se formează asce cu ascospori.

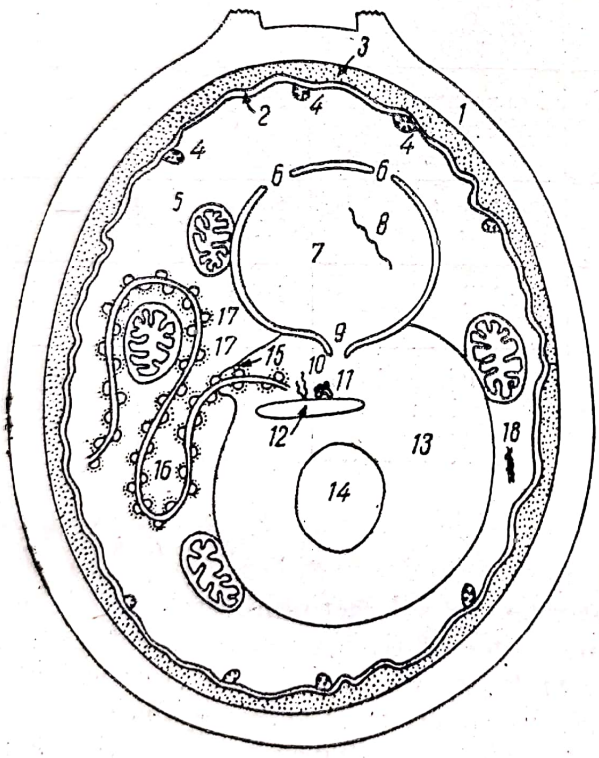


Fig. 236. Structura internă a unei levuri (după Lindegren):

1 — perete celular; *2* — membrana citoplasmatică; *3* — strat nucleoproteic; *4-5* — mitocondrii; *6* — deschideri ale fusului adiacent vacuolei nucleare; *7* — rezervorul fusului; *8* — ADN dispersat omogen; *9* — deschidere prin care cromozomii intră în vacuola nucleară; *10* — ADN organizat; *11* — proteina receptoare; *12* — baza histonică a cromozomului; *13* — vacuola nucleară; *14* — nucleol; *15* — loc de ieșire al reticulului endoplasmic din vacuola nucleară în citoplasmă; *16* — reticul endoplasmic; *17* — ribozomi; *18* — ARNt.

O caracteristică biochimică și biologică importantă a levurilor este capacitatea lor de a produce *fermentația* caracteristică a mediilor care conțin diferite substanțe hidrocarbonate. Desemnarea acestor microorganisme prin termenul de levuri (de la lat. *levere*=a ridica; de la fr. *levain*=aluat dospit) reflectă efectul vizibil al acțiunii lor fermentative, și anume liberarea sub formă de bule a unui gaz — CO_2 — care împinge în sus drojdia formată în lichidele zaharate în curs de fermentare sau provoacă afînarea și creșterea în volum a aluatului de făină și apă. Drojdia reprezintă de fapt masa enormă de celule rezultată din multiplicarea microorganismelor de fermentație pe seama substratului nutritiv pe care-l constituie produsul fermentescibil, de unde denumirea de drojdii, echivalentă aceleia de levuri.

În secolul al XV-lea se considera că depozitul format la fundul vasului, o dată terminată fermentarea vinului sau a altui lichid zaharat, ar fi un adevărat produs de excreţie *(faces vini)*, a cărui eliminare ar determina limpezirea şi înnobilarea lichidului de deasupra. Cu mult mai tîrziu, Mayena a arătat că acest depozit este format din celulele unor microorganisme pe care le-a numit „ciuperci de zahăr" *(Saccharomyces)*.

a. Morfologie şi structură internă

Celulele de drojdie au în mod obişnuit o formă sferică, ovalară sau alungită. Unele tulpini sînt *monomorfe*, în sensul că se prezintă în mod obişnuit sub formă de celule de un singur tip, în timp ce altele sînt *dimorfe* sau *polimorfe*, celulele lor fiind cu regularitate de două sau mai multe tipuri. Ca şi la bacterii, chiar în cazul drojdiilor monomorfe forma şi dimensiunile variază în funcţie de starea fiziologică a celulei şi de condiţiile de mediu. În afară de forma tipică, ovalară sau alungită, drojdiile mai pot prezenta forme caracteristice pentru diferite genuri sau specii, ca: elipsoidală *(S. ellipsoideus)*, sferică *(Torula)*, triunghiulară *(Trigonopsis)*, apiculată, asemenea unei lămîi *(Nadsonia, Kloeckera, Hanseniaspora)*, filamentoasă *(Candida, Ashbya, Endomyces)* etc.

Mărimea medie a drojdiilor este de $4—8 \times 7—12\ \mu$, cu limitele minime de $1—3\ \mu$ şi maxime $8—12 \times 14—20\ \mu$. Formele miceliale sau pseudomiceliale pot atinge dimensiuni de $70 \times 8—12\ \mu$. În medie, suprafaţa lor este de $118\ \mu^2$, volumul de $118\ \mu^3$, iar greutatea de $1{,}3 \times 10^{10}$ g.

Peretele celular are o grosime variabilă după condiţiile de cultivare, apreciată de Hagedorn la 1 500—2 500 Å, iar de Moor la numai 700 Å, şi o structură granulară, mai fină la exterior şi progresiv mai grosieră spre straturile mai profunde. El este alcătuit din două sau trei straturi şi conţine polimeri de glucoză (glucan) şi manoză (manan), proteine şi chitină. La nivelul lui îşi au sediul diferite sisteme enzimatice hidrolizante (de exemplu, invertaza), sau implicate în transportul diferitelor substanţe în celulă (permeaze).

Enzimele ar fi localizate în peretele celular, legate de unele structuri ale acestuia, sau s-ar acumula în spaţiul dintre perete şi membrana citoplasmatică *(periplasma* lui Rose). Pe suprafaţa peretelui celular se găsesc zone caracteristice cores-

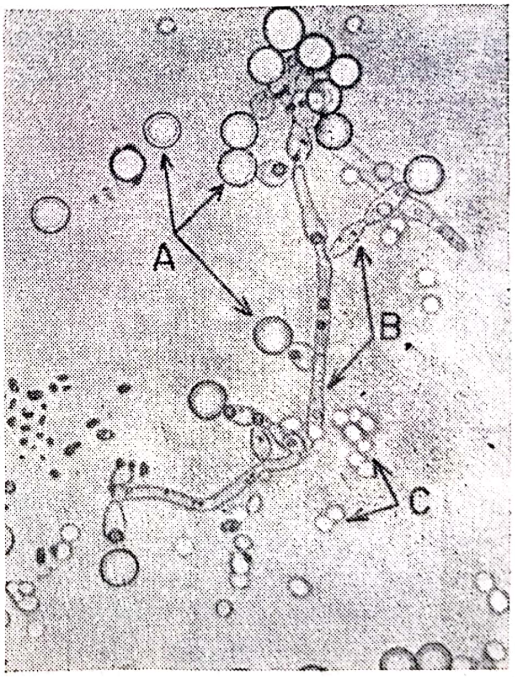


Fig. 237. Polimorfismul la *Candida albicans*: *A* — clamidospori; *B* — pseudohife (celule levuriforme aşezate cap la cap); *C* — celule de tip levură în curs de înmugurire (după Kobayashi).

Fig. 238. Structura fină a peretelui celular la *Candida tropicalis*. Fibrele de hidroglucan sînt întreţesute la întîmplare, exceptînd zona cicatricei mugurelui, unde sînt aranjate ordonat (după Houwink).

Fig. 239. Peretele celular al levurilor prezentînd cicatrice la locul de desprindere a mugurilor (după Northcote)

punzînd cicatricelor lăsate de muguri după desprinderea lor de celula-mamă. Cicatricele au un aspect convex pe celula-mamă şi concav pe celula-fiică; teoretic, numărul lor poate ajunge la 10—15 pe suprafaţa unei celule. Peretele celular este subţire şi flexibil la celulele tinere, mai gros şi rigid la cele bătrîne. El are rolul de a proteja constituenţii celulari şi de a controla schimburile şi interacţiunile dintre celulă şi mediu.

Membrana citoplasmatică separă de peretele celular protoplastul reprezentînd conţinutul celular, la care aderă atît de intim încît nu poate fi îndepărtată decît prin şoc osmotic. Ea apare cu o grosime de circa 80 Å şi este alcătuită din două straturi, intern şi extern, mai dense pentru electroni, separate de un strat intermediar mai clar. În special la celulele bătrîne, membrana citoplasmatică prezintă 10—15 porţiuni invaginate pe μ^2, care se imprimă pe suprafaţa internă a peretelui celular. Aceste invaginări, lungi de circa 3 000 Å, late de 200—300 Å şi adînci de 500 Å, îi dau un aspect de membrană sculptată şi îi măresc suprafaţa cu cel puţin 50% în raport cu membrana complet netedă a celulelor tinere. Ea este alcătuită din lipoproteine, ribonucleoproteine, polizaharide şi compuşi ai calciului. Membrana citoplasmatică este implicată în fenomenele de absorbţie şi eliminare. Moor (1963) a evidenţiat în stratul ei extern grupuri de 20—50 de particule, dispuse ordonat în aranjamente hexagonale, situate între invaginările membranei citoplasmatice şi în strînsă legătură cu structuri fibrilare de 50 Å. Aceste zone ar corespunde unor centri la nivelul cărora s-ar produce polimerizarea glucozei şi cristalizarea polimerului în fibrile de glucan, constituent de bază al peretelui celular.

Fig. 240. *Saccharomyces cerevisiae:* suprafaţa membranei citoplasmatice alcătuită din particule în aranjamente hexagonale situate între invaginările membranei (după Moor).

Citoplasma are un aspect diferit în funcţie de vîrsta celulei. La celulele tinere ea are un aspect omogen şi ocupă în întregime conţinutul celular, în timp ce la celulele bătrîne este neomogenă şi refrigerentă din cauza vacuolelor şi incluziilor. Datorită constituenţilor săi chimici (proteine, lipide, glucide, ARN), citoplasma are un prag ridicat de viscozitate, care, mai ales la celulele în stare de repaus sau bătrîne, poate să depăşească de 8 000 de ori viscozitatea apei. La celulele tinere se observă curenţi citoplasmatici care determină mişcări circulare şi contracţionale. Pe microelectronografii, citoplasma celulelor tinere are aspect de matrice uniform structurată, conţinînd granule de 100—200 Å, iar aceea a celulelor bătrîne apare în formă de grămezi de unităţi globulare cu Ø de aproximativ 400 Å, formate la rîndul lor din granule fine de circa 60 Å.

Reticulul endoplasmatic se prezintă ca un sistem membranos tubular, dublu lamelar, cu Ø de 120—150 Å, conectat cu membrana nucleară externă. El este o structură celulară destul de instabilă, mai dezvoltată, mai ramificată şi prezentînd uneori mici vezicule pe ramificaţiile terminale în celulele cultivate în anaerobioză. Reticulul endoplasmatic este considerat ca o cale de transport a diferiţilor metaboliţi celulari. După Moor (1967) el participă la procesul de multiplicare, avînd rolul de a declanşa formarea mugurilor prin intermediul unor enzime localizate la nivelul său.

Nucleul reprezintă un constituent a cărui structură şi ale cărui raporturi cu celelalte organite celulare sînt încă foarte controversate. După Moor, la *S. cerevisiae* nucleul apare ca o formaţie cu aspect globular avînd un diametru

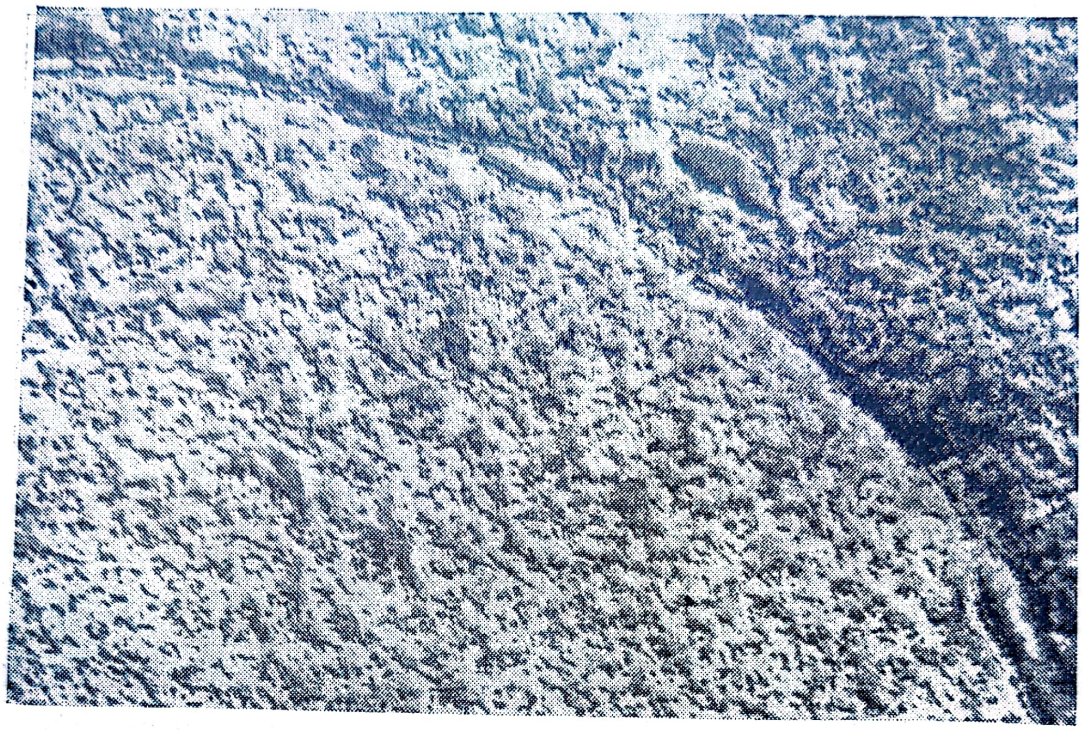


Fig. 241. *S. cerevisiae:* membrana nucleară cu structură stratificată. *Dreapta sus* — citoplasma; *stînga jos* — nucleoplasma (după Moor).

caracteristic de aproximativ 2,3 μ. Mărimea lui se modifică numai în cazul poliploidiei sau în cursul diviziunii nucleare. Forma lui normală poate fi modificată de presiunea exercitată asupra membranei nucleare de vacuole sau de granulele lipidice, care determină formarea unei concavităţi la nivelul corespunzător. Ca la orice celulă eucariotă, nucleul levurilor este acoperit de o membrană nucleară, formată din două straturi şi prezentînd pe întreaga ei suprafaţă circa 200 de pori circulari cu Ø 800—900 Å, grupaţi în general cîte 10—15 pe μ^2, care ocupă 6—8% din suprafaţa membranei nucleare. După datele lui Eckstein (1958) şi Robinow (1961), conţinutul nuclear este diferenţiat în particule de cromatină (cromozomi), un nucleol şi o carioplasmă. Alţi autori contestă această diferenţiere internă şi consideră că toţi constituenţii nucleari ar avea o distribuţie uniformă, sub forma unor unităţi structurale granulare nu mai mari de 100 Å, legate între ele prin legături intermoleculare care împiedică pierderea lor prin pori, dar care nu le fixează în structuri stabile care să poată fi diferenţiate cu metodele folosite pînă în prezent.

Mitocondriile au o structură similară aceleia a mitocondriilor din celulele animalelor şi ale plantelor superioare. În celulele pe cale de creştere, ele apar ca formaţiuni aproximativ cilindrice, scurte, cu dimensiuni de 1—2 μ × ×0,5—1 μ. În celulele mature, mitocondriile sînt mai lungi, de circa 3 μ şi au o grosime de 0,3—0,5 μ. Totdeauna situate în apropierea membranei citoplasmatice, mitocondriile sînt înconjurate de două membrane, dintre care cea internă se pliază spre interior, formînd „cristele" caracteristice al căror contur

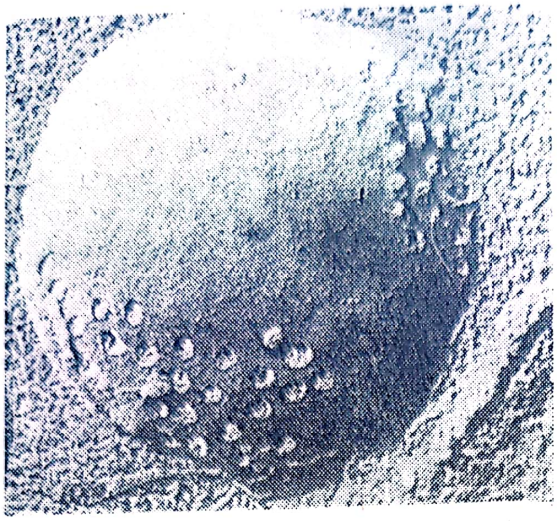


Fig. 242. *S. cerevisiae:* Suprafaţa nucleului unei celule bătrîne. Porii membranei nucleare sînt concentraţi în anumite zone (după Moor).

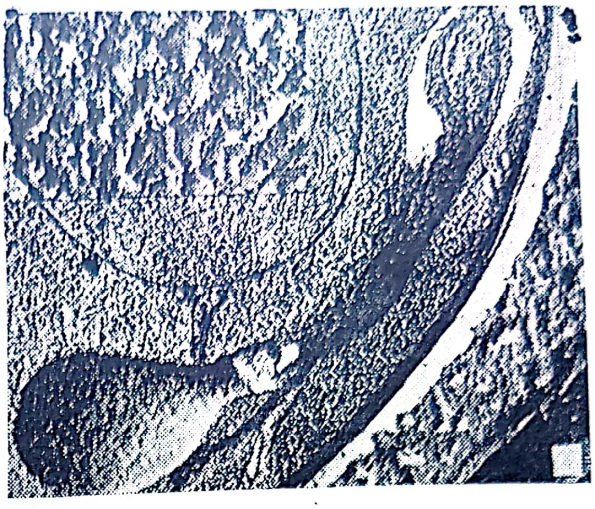


Fig. 243. *S. cerevisiae.* Mitocondrie mare în formă de halteră, probabil pe cale de diviziune (după Moor).

dublu este foarte evident deoarece cele două lamele care constituie membrana internă sînt separate de un spaţiu interlamelar gol, lat de 50—100 Å. Cristele pătrund în matricea mitocondrială, care are o structură granulară mai densă decît aceea a citoplasmei. Numărul lor este variabil. În condiţii normale de cultură, fiecare celulă conţine 40—50 de mitocondrii. Mitocondriile îndeplinesc funcţii de importanţă excepţională pentru viaţa levurilor, deoarece conţin sisteme enzimatice care participă la metabolismul energetic al celulelor, la procesul de activare a aminoacizilor, la metabolismul lipidelor etc. După Ephrussi (1953), la levuri mitocondriile ar fi sediul mecanismelor extranucleare ale eredităţii.

Ribosomii reprezintă în celulele de *Saccharomyces* pe cale de creştere şi multiplicare un constituent citoplasmic dominant. După cum s-a dovedit prin ultracentrifugare analitică, ei sînt constituiţi din mai multe fracţiuni cuprinse între 30 S şi 120 S. Ribozomii participă în procesul de biosinteză a proteinelor.

Aparatul lui Golgi apare sub forma unui complex de vezicule, mai ales la celulele care formează spori sau înmuguresc. Datorită dimensiunilor lui mici şi numărului redus de unităţi pe celulă (1 sau 2), el nu poate fi pus în evidenţă în mod constant. După unii autori, aparatul golgian ar participa la metabolismul lipidelor, în timp ce după alţii el ar contribui la sinteza peretelui celular.

Vacuolele reprezintă constituentul cel mai evident în celulele de drojdie necolorate. Structura fizico-chimică şi semnificaţia lor biologică constituie obiectul multor controverse, în special în ceea ce priveşte vacuola centrală. După Moor, vacuolele mici au diametrul de aproximativ 0,3 μ şi sînt de obicei agregate în grupuri de cîte 5—6, dispuse în jurul nucleului, în timp ce vacuolele mari au diametrul de peste 3 μ şi apar izolat. Ele sînt înconjurate de o membrană periferică, derivată probabil din reticulul endoplasmatic,

Unii cercetători consideră vacuolele ca structuri tranzitorii a căror apariţie este determinată de vîrsta celulei şi de condiţiile de mediu, în timp ce alţii admit că ele reprezintă formaţiuni cu caracter constant, permanente dar supuse unor modificări de formă şi mărime în funcţie de acţiunea unor factori neprecizaţi sau mascate uneori de diferite granulaţii din matricea citoplasmatică. După unii autori, vacuola centrală, cu contur neregulat, adiacentă nucleului ar comunica printr-o deschizătură cu acest organit, formînd împreună cu el nucleul complet. În general însă, se consideră că vacuomul ar avea rolul de a depozita diferite substanţe în exces — în forma lor originară sau transformate în substanţe de rezervă — precum şi funcţia de a regla presiunea osmotică intracelulară.

Granulele lipidice au o formă globulară, cu diametrul de 1 000—7 000 Å şi un conţinut cu densitate uniformă. În număr de 2—4 în celulele tinere, ele pot fi numeroase în celulele mature. Structura lor sugerează o creştere prin apoziţie, realizată prin adăugarea succesivă a unor structuri concentrice de lipide, probabil fosfatide. Funcţia lor principală ar fi aceea de depozitare, deşi unii autori au emis ipoteza că ele ar funcţiona ca un adevărat organit celular, probabil cu rol efectiv în metabolismul lipidelor.

Incluziile de polimetafosfaţi reprezintă o rezervă de substanţă energetică depusă sub forma unor picături mici, deformabile, care uneori pot conflua. Numărul lor diminuă foarte mult în condiţii de înfometare. Ele au un rol foarte important în viaţa celulei, deoarece metabolismul lor este legat de procese biologice esenţiale, ca respiraţia şi biosinteza proteinelor şi a acizilor nucleici.

Incluziile de glicogen apar sub formă de granulaţii refringente cu diametrul de aproximativ 300 Å, repartizate în citoplasmă sau depozitate în vacuole. Ele constituie forma de rezervă hidrocarbonată tipică. În medie, glicogenul reprezintă 3% din greutatea uscată a celulei, dar poate ajunge pînă la 39% în unele cazuri.

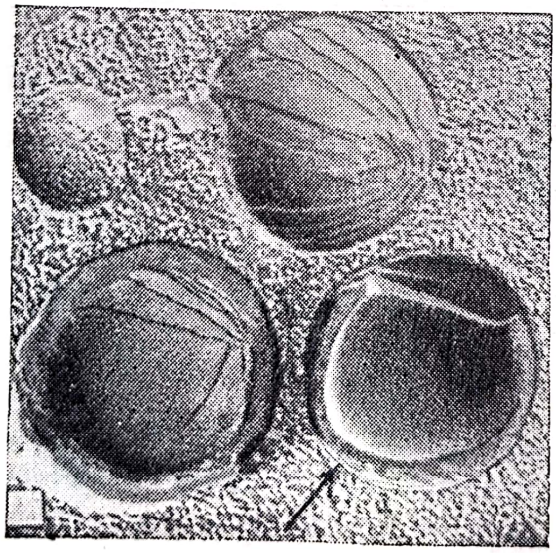


Fig. 244. *S. cerevisiae:* granule lipidice de rezervă prezentînd o structură multistratificată care indică depunerea concentrică a fosfatidelor (după Moor).

Incluziile de volutină sau de metacromatină, rezervă de N şi de metafosfat, pot fi evidenţiate prin coloraţii speciale sub forma unor granulaţii prezente în vacuole, în cantităţi variabile după condiţiile de mediu.

b. Compoziţia chimică

În celulele de drojdie se regăsesc aceiaşi constituenţi chimici ca şi la celula bacteriană: apă (70—72% din greutatea celulelor vii), proteine şi acizi nucleici, glucide, lipide, substanţe minerale, vitamine, pigmenţi şi un bogat echipament enzimatic.

Proteinele reprezintă 30—70% din greutatea uscată a celulelor, în funcţie de starea fiziologică a celulei şi de condiţiile de mediu; ele conţin toţi aminoacizii naturali.

Acizii nucleici sînt distribuiţi inegal în celulă: ARN, care se găseşte mai ales în citoplasmă, predomină cantitativ faţă de ADN, localizat în nucleu.

Glucidele au rol structural (de exemplu glucozamina, chitina, mananul şi glucanul din peretele celular), intră în constituţia unor molecule esenţiale ca ADN (dezoxiriboza) şi ARN (riboza) sau sînt depozitate ca substanţe de rezervă (glicogen, trehaloză).

Lipidele reprezintă în medie 2—5% din greutatea celulelor uscate, dar pot ajunge la unele specii *(Torulopsis lipofera, Endomyces vernalis, Oospora lactis)* să depăşească valoarea de 50%; ele sînt alcătuite din trigliceride, glicerofosfatide şi steroli (de exemplu, ergosterol).

Substanţele minerale variază între 2 şi 10% din greutatea uscată a celulei, în funcţie de mediul nutritiv; ele sînt formate în ordine descrescîndă din P, K, Mg, Ca, Na, Cl, Fe, Si, Al, Cr, Co, Cu.

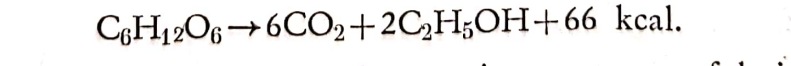
Vitaminele se găsesc în cantităţi foarte mari, în special vitaminele din grupul B (B_1—B_{12}), provitamina D (ergosterol) şi carotenoizii înrudiţi cu vitamina A. Vitaminele hidrosolubile se găsesc parţial în stare liberă şi de aceea difuzează uşor şi se pot acumula în mediu.

Pigmenţii de diferite culori (roşu, oranj, vişiniu etc.) colorează celulele şi coloniile în mod caracteristic, astfel că pigmentogeneza poate fi folosită drept criteriu taxonomic.

Echipamentul enzimatic este foarte complex, ceea ce explică activitatea fiziologică intensă şi variată a celulelor de drojdie. Unele enzime sînt în relaţie cu anumite structuri sau organite celulare: de exemplu, invertaza este asociată cu mananul din peretele celular, iar enzimele respiraţiei terminale sînt localizate în mitocondrii.

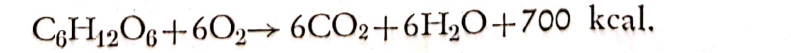
c. Metabolism

Levurile folosesc ca sursă de C diferite zaharuri, acizi organici, glicerolul, intermediari ai metabolismului lipidelor etc., iar ca sursă de N produse rezultate din hidroliza proteinelor (proteaze, peptone, aminoacizi), amoniac, uree etc. Ele au nevoie şi de factori de creştere ca tiamină, biotină, inozitol, piridoxină şi acid pantotenic. Temperatura optimă de dezvoltare este cuprinsă între 20 şi 30°C, *p*H-ul optim este 4,5—5,0 (limitele tolerate fiind: *p*H 3—*p*H 7,5). În anaerobioză, levurile realizează fermentaţia alcoolică a zaharurilor cu producere de CO_2 şi alcool etilic, după formula:



$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CO_2 + 2C_2H_5OH + 66 \text{ kcal.}$$

Din energia eliberată prin fermentaţie numai o parte este folosită pentru asimilare, iar restul este transformată în căldură. În aerobioză ele oxidează complet hexozele, după formula:



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 700 \text{ kcal.}$$

În aceste condiţii, o mică parte din glucidele din mediu furnizează energie, care este utilizată de celule pentru asimilarea restului de substrat, astfel încît creşterea substanţei celulare în aceste condiţii este deosebit de intensă în raport cu aceea realizată în anaerobioză. Această comportare metabolică pregnant diferenţiată în funcţie de prezenţa oxigenului este folosită în industrie, unde se creează, după caz, condiţii de anaerobioză atunci cînd produsul dorit este alcoolul, sau condiţii de aerare puternică, atunci cînd este nevoie să se obţină o masă celulară abundentă din care se prelucrează produsul denumit „drojdie de bere".

d. Reproducere

Levurile se pot reproduce pe două căi, şi anume pe cale asexuată — prin *înmugurire* sau prin *diviziune directă* — şi pe cale sexuată, printr-un proces de *conjugare*.

Reproducerea asexuată, întîlnită la toate drojdiile, reprezintă modul tipic de multiplicare a celulelor aflate în condiţii de mediu favorabile, în timp ce reproducerea sexuată însoţită de sporulare este observată numai la aproximativ 50% din specii şi anume la drojdiile sporogene.

Înmugurirea constituie modalitatea caracteristică de multiplicare asexuată a drojdiilor. Ea constă în formarea unui mugure, reprezentînd o celulă-fiică, apărut ca o protuberanţă la suprafaţa celulei-mame. Pe celula lor de origine, mugurii pot fi dispuşi polar, bipolar sau multilateral.

Procesul este iniţiat de un semnal chimic emis de la nivelul reticulului endoplasmic, care determină o evaginare locală limitată a peretelui celular, antrenînd şi masa protoplasmică subiacentă. Formaţiunea astfel constituită, iniţial cu un aspect de sferă minusculă, se măreşte treptat pînă ce atinge, uneori, dimensiunile celulei-mamă. Pe măsură ce mugurele creşte, peretele celular prin care el este legat de celula sa de origine se strangulează din ce în ce, pînă cînd se ajunge la separarea completă a celor două celule. Bradley (1956) a arătat că, după separarea celulelor, la locurile respective de legătură se observă pe suprafaţa pereţilor celulari cîte o cicatrice (cicatricea mugurelui), care este concavă la celula-fiică şi convexă la celula-mamă. Celulele-fiice nu se separă însă totdeauna de celula-mamă, ci pot să rămînă ataşate de aceasta,

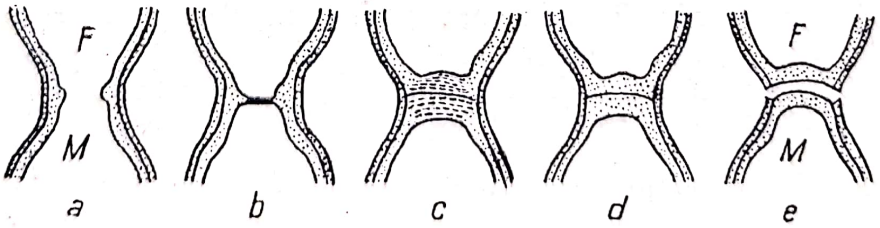


Fig. 245. Reprezentarea schematică a etapelor succesive ale multiplicării drojdiilor prin înmugurire:

M — celula-mamă; *F* — mugurele; *a* — începutul formării peretelui despărţitor; *b* — separarea printr-un sept transversal subţire; *c* — îngroşarea peretelui celular; *d* — sfîrşitul formării septului despărţitor; *e* — separarea celulei-mamă de celula-fiică (după Hagedorn).

în timp ce se formează în continuare muguri adiţionali, atît pe celula-mamă, cît şi pe celulele derivate din ea. În felul acesta, într-o cultură de drojdii care se multiplică prin înmugurire pot apărea grupuri arborescente de 50—60 de celule care alcătuiesc formaţiuni pseudomiceliene.

Diviziunea directă, caracteristică drojdiilor din genul *Schizosaccharomyces*, se aseamănă cu procesul omolog descris la bacterii. Alungirea celulei este urmată de diviziunea nucleului, cu migrarea consecutivă a celor doi nucleii-fii către extremităţile celulei, după care are loc separarea celor două celule-fiice prin formarea unui sept transversal în celula-mamă. Celulele fiice pot fie să se despartă complet, fie să rămînă în continuare legate sub forma unui pseudomiceliu.

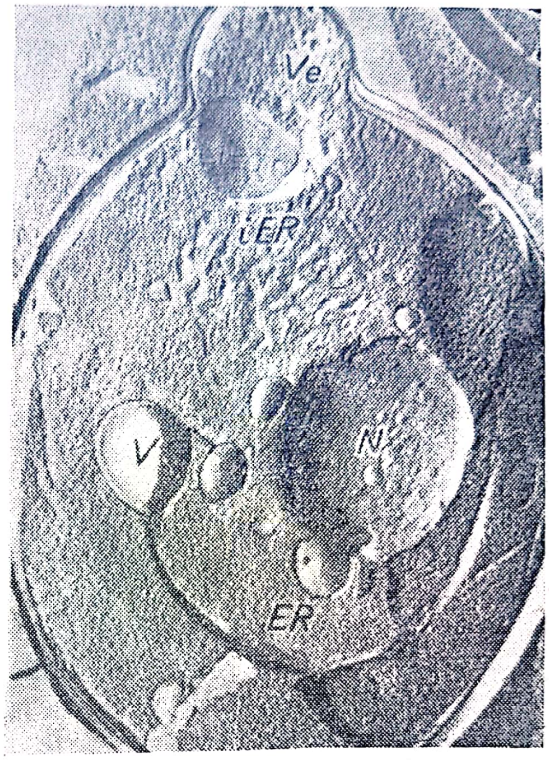


Fig. 246. *S. cerevisiae* în fază avansată de înmugurire: *Ve* — vezicule formate din reticulul endoplasmic (*ER*); *V* — vacuola; *N* — nucleu (după Moor).

Reproducerea sexuată, proprie drojdiilor din speciile sporogene, implică unirea printr-un proces de conjugare a două celule sexuale numite g a m e ţ i. Cel mai simplu proces sexual de acest tip se întîlneşte la drojdiile din genul *Saccharomyces*, la care dezagregarea pereţilor celulari în zona de adiacenţă a două celule alipite determină formarea unei celule mai mari decît fiecare dintre cele două partenere de conjugare. Această celulă — care reprezintă un *zigot* — se poate multiplica în continuare prin înmugurire sau poate să se transforme într-o *ască* în interiorul căreia se formează de obicei patru *ascospori*, apţi la rîndul lor de copulaţie, fie după eliberarea lor în mediul extern, fie — uneori — chiar în interiorul ascăi. În funcţie de gradul de diferenţiere a celulelor-gameţi, procesele de conjugare mai complexe care au loc la celelalte drojdii sporogene pot fi de tip izogam sau heterogam.

— C o n j u g a r e a i z o g a m ă, descrisă la drojdiile din genul *Schizosaccharomyces*, se realizează prin fuzionarea într-un zigot a două celule morfologic identice dar cu polarizare sexuală diferită, ceea ce le conferă funcţia de gameţi. Procesul începe prin emiterea a cîte unei proiecţii celulare, aşa-numiţii *tubi de conjugare*. Aceştia se unesc prin porţiunile lor terminale, după care pereţii celulari intermediari de la locul de unire a tubilor de conjugare se lizează, făcînd astfel posibilă fuzionarea conţinutului celular al gameţilor şi formarea unui *zigot*. Acesta se poate transforma într-o ască de formă regulată, în care toţi ascosporii se constituie într-un singur grup — atunci cînd fuziunea morfologic perfectă a avut ca urmare formarea unei celule-zigot

evident unice — sau poate să fie echivalentul unei asce în formă de halteră, în care ascosporii se grupează separat în cele două celule parentale, fuzionate dar încă distincte morfologic, datorită persistenţei canalului de conjugare care le leagă.

— Conjugarea heterogamă, care implică unirea a două celule sexuale diferite nu numai ca polarizare sexuală dar şi ca mărime şi ca vîrstă, se poate realiza în mai multe moduri. Astfel, la unele drojdii (de exemplu la cele din genul *Debaromyces*), gametul mascul, foarte mic, se formează ca un mugure la suprafaţa unei celule vegetative care devine un gamet femel, apoi nucleul mugurelui mascul se uneşte cu nucleul celulei-mame femele şi astfel aceasta devine un zigot care se transformă într-o ască unde se diferenţiază ascospori. La alte levuri, ca unele specii de *Nadsonia*, zigotul format printr-un mecanism similar, generează un mugure nou, care creşte şi, primind întregul conţinut celular al zigotului, se transformă pe această cale într-o ască în care se vor diferenţia unul sau, rareori, doi ascospori.

Sporogeneza apare la drojdii, cu foarte rare excepţii, ca o consecinţă a procesului de conjugare.

Tipul cel mai caracteristic de spori la drojdii este *ascosporul* care ia naştere în ască, celula reprezentînd un zigot şi avînd formă şi dimensiuni variabile după gen, dar fiind, în genere, de mărime egală aceleia a formei vegetative, ca la *Saccharomyces*, sau mai mare decît celula vegetativă, ca la *Schizosaccharomyces*. Dacă în ască sînt mai mulţi spori, ei rezultă din diviziuni nucleare urmate de diviziuni corespunzătoare ale citoplasmei şi de formarea unor membrane sporale individuale. Numărul ascosporilor dintr-o ască este deseori caracteristic şi corespunde în general numărului de diviziuni nucleare. Astfel, *Monosporella* are un singur ascospor, în timp ce *S. cerevisiae* are 4 ascospori, *Schizosaccharomyces octosporus* are 8, iar *Eremothecium ashbyi* — 32. De

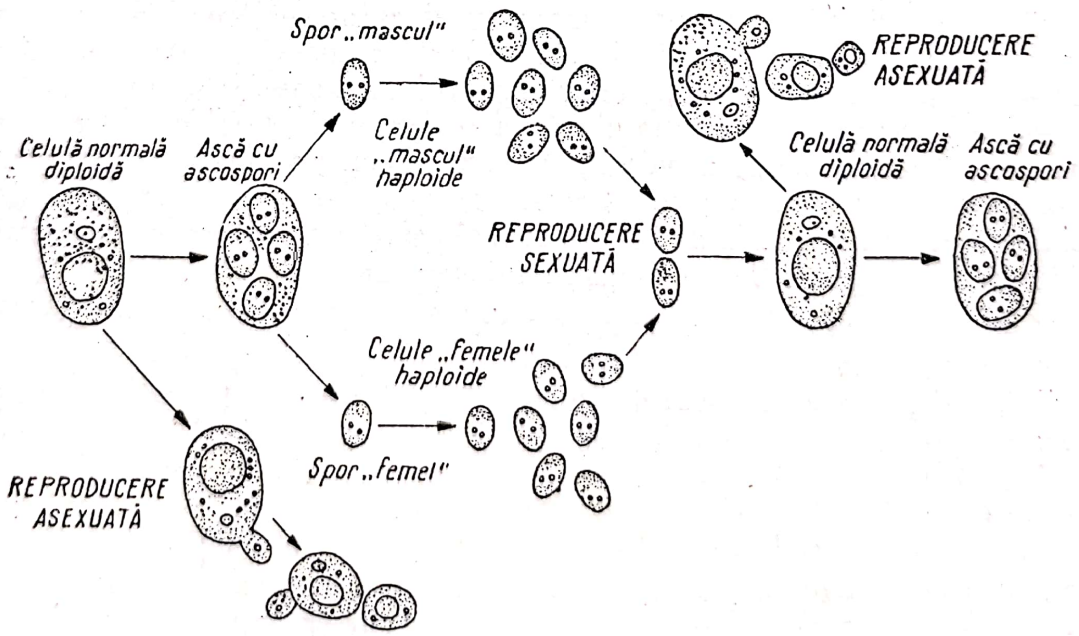


Fig. 247. Ciclul de reproducere sexuată şi asexuată la *S. cerevisiae*.

foarte multe ori, numărul ascosporilor dintr-o ască este însă inferior celui caracteristic speciei, datorită faptului că — printr-un mecanism necunoscut — nu toţi nucleii rezultaţi din diviziunea nucleului ascal participă pînă la capăt în procesul de formare a ascosporilor. Forma ascosporilor este variată, putînd fi — în funcţie de specie — sferică, hemisferică, ovalară, reniformă, aciculară sau neregulată. Învelişul lor, cu suprafaţa netedă sau rugoasă, constă dintr-un perete gros unic sau, cel mai adesea, dublu, alcătuit dintr-un exosporiu gros de 400 Å, bogat în lipide, şi un strat intern omogen gros de 700 Å.

Germinarea ascosporilor se face de obicei în două etape: se produce mai întîi dehiscenţa ascei — prin ruperea peretelui celular sub presiunea din interior a ascosporilor în creştere — urmată de liberarea sporilor viabili, iar apoi are loc germinarea propriu-zisă a ascosporilor ajunşi liberi în mediu. La unele specii, faza de germinare propriu-zisă este iniţiată chiar în interiorul sporangelui. În cursul germinării sporul suferă modificări morfologice tipice: el se umflă, vacuola lui se măreşte, exosporiul se rupe pentru a permite emisia tubului de germinaţie, iar stratul intern al membranei sporale urmează dezvoltarea celulei vegetative noi al cărui perete îl constituie.

Sporularea reprezintă o funcţie biologică normală în ciclul de viaţă al drojdiilor sporogene. Acest ciclu are două faze: una *haploidă*, în care celulele conţin un număr dat de cromozomi (n), şi alta *diploidă*, în care numărul cromozomilor este dublu ($2n$). Prin procesul de conjugare între gameţii haploizi, încheiat cu formarea unui zigot diploid, asca în care se diferenţiază ascosporii, se face trecerea de la faza haploidă la cea diploidă, iar prin diviziunea reducţională sau meiotică, survenită într-un moment oarecare al existenţei fazei vegetative dar totdeauna premergător formării celulelor sexuale, se trece de la diplofază din nou la haplofază. Aceste procese se succed uneori la un interval scurt, dar alteori între ele se scurge un timp îndelungat, în decursul căruia celulele vegetative se pot multiplica prin înmugurire.

Unui alt tip de spori îi aparţin b a l i s t o s p o r i i, care apar pe cale asexuată la levurile din genul *Bullera* şi *Sporobolomyces*, specii care în mod obişnuit se reproduce prin înmugurire. Cultivate pe un mediu solid, celulele formează mici prelungiri aeriene numite *sterigme*, la capătul cărora se formează cîte o mică celulă sferică sau reniformă — balistosporul. Cînd balistosporul ajunge la maturitate, presiunea exercitată de un lichid secretat la nivelul joncţiunii lui cu celula-mamă îl proiectează exploziv la distanţă, impulsul primit făcîndu-l să plutească un timp în aer. Procesul se poate repeta în continuare de mai multe ori succesiv.

În sfîrşit, la levuri există şi spori de tip mixt — c h l a m i d o s p o r i i, proveniţi fie din ascospori, fie din balistospori, la care s-a format un perete celular gros şi rigid şi în interiorul cărora s-au acumulat picături de grăsime şi au apărut vacuole. Chalmidosporii se formează în special în culturile vechi.

Semnificaţia biologică a sporilor levurilor depinde în anumite privinţe de tipul lor. Indiferent de tip — şi spre deosebire de sporii bacterieni — ei sînt însă toţi implicaţi în procesul de reproducere, indiferent dacă acesta se reali-

Scanned with OKEN Scanner

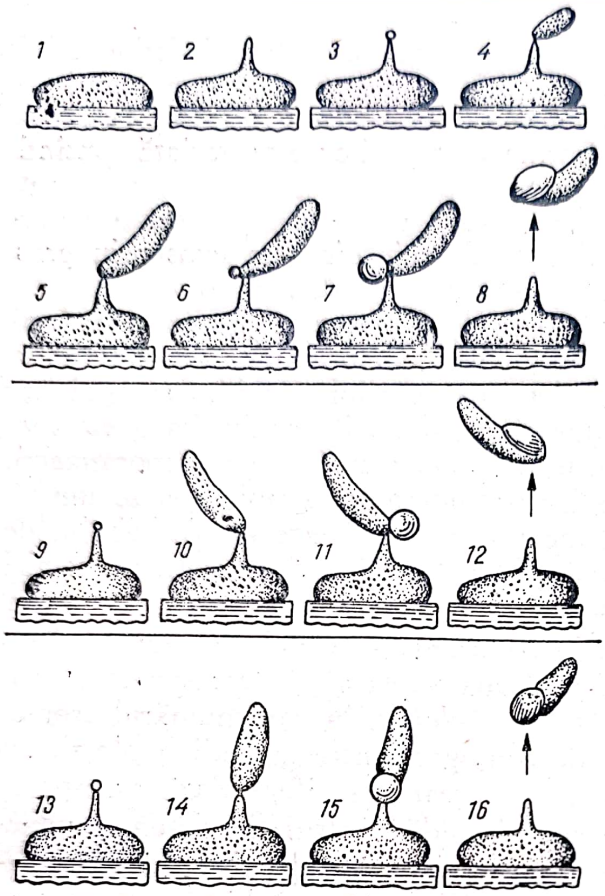


Fig. 248. Formarea şi liberarea succesivă (*1—16*) a trei bazidiospori de către aceeaşi celulă de *Sporobolomyces* (după Buller).

zează pe cale sexuată (ascosporii) sau asexuată (balistosporii). Prin modul în care se formează, ascosporii reprezintă şi originea unor celule vegetative cu caractere noi, rezultînd din recombinarea materialului genetic provenit de la celule parentale care diferă prin anumite caractere. Pe de altă parte, sporii drojdiilor sînt, în genere, şi o formă de rezistenţă favorizînd menţinerea şi diseminarea speciei în natură. Fără a avea rezistenţa sporilor bacterieni, ascosporii suportă totuşi condiţii de mediu care celulelor vegetative le sînt defavorabile: ei rezistă la temperaturi scăzute (circa 3 luni la —15°C) şi la uscăciune (circa 4 ani în sol); balistosporii, aruncaţi la distanţă de substratul nutritiv şi plutind în aer supravieţuiesc în aceste condiţii asigurînd astfel lărgirea mai eficace a ariei de colonizare a speciei, iar chlamidosporii au o deosebită capacitate de a se menţine viabili la uscăciune şi în alte condiţii defavorabile sau chiar nocive pentru celulele vegetative.

Sporogeneza este un caracter cu valoare taxonomică, prezenţa şi tipul sporilor, în genere, ca şi mărimea, forma, numărul, geneza şi germinarea ascosporilor constituind criterii importante de identificare şi clasificare a speciilor din grupul drojdiilor.

e. Taxonomie

Tendinţa actuală în această privinţă este ca la identificarea şi clasificarea drojdiilor să se folosească toate caracteristicile lor morfologice, biochimice, genetice, serologice etc. Deşi studiile în această direcţie sînt numeroase şi aprofundate, nu există totuşi pînă acum un acord unanim asupra sistematicii levurilor. După J. Lodder şi Kreger-Van-Rij, care propun în prezent sistemul cel mai logic şi mai simplu de clasificare, drojdiile se grupează în trei familii din phyllum *Eumycetes*, care sînt ataşate cîte unei clase de *Fungi*, şi anume: *1*) fam. *Endomycetaceae* (drojdiile care formează ascospori, incluse în clasa *Ascomycetes*); *2*) fam. *Sporobolomycetaceae* (levurile care formează balistospori, incluse în clasa *Basidiomycetes*) şi *3*) fam. *Cryptococcaceae* (drojdiile care nu formează spori, ataşate la clasa *Fungi imperfecti*).

f. Răspîndire în natură şi importanţă

Levurile sînt foarte larg răspîndite în natură, locurile lor de acumulare maximă fiind legate de prezenţa hidrocarbonatelor, de obicei de natură vegetală. Din aceste locuri, levurile sînt răspîndite pretutindeni cu ajutorul curen-

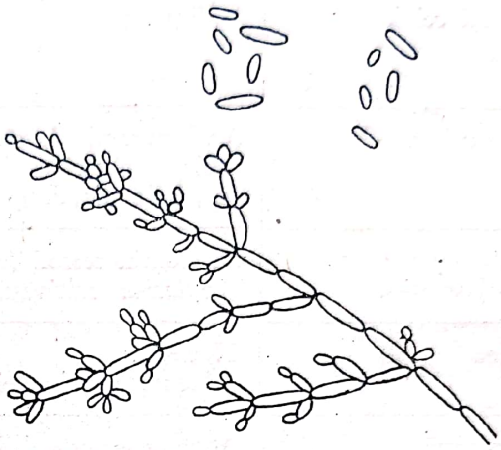


Fig. 249. Structură pseudomiceliană la *Candida*. Se observă fragmentarea talului şi înmugurirea miceliului pentru a forma blastospori (după Plunket).

ţilor de aer, al ploii şi al insectelor. Ele sînt prezente şi în ape, mai ales în apropierea resturilor vegetale în curs de descompunere, precum şi în mări, uneori în cantităţi considerabile şi la distanţe mari de ţărm. În sol, drojdiile se găsesc în cantităţi relativ mici, trăind mai ales în straturile lui superficiale. Un număr mare de levuri aparţinînd la diferite genuri se adună pe plante, multiplicîndu-se în nectarul florilor sau în fructe. Pe boabele de strugure coapte numărul lor poate să ajungă foarte ridicat; numărători făcute pornind de la boabe zdrobite dau, de exemplu 10^5 celule/ml suc.

Unele levuri sînt patogene pentru plante (*Ashbyia gossypii* şi *Nematospora coryli*) sau pentru om şi animale (*Candida albicans, Cryptococcus neoformans* etc.).

Drojdiile sînt larg folosite în practică pentru obţinerea unor produse cu ajutorul activităţii lor fermentative (în industria spirtului, vinificaţie, panificaţie, industria berii), pentru producţia de masă celulară (drojdii furajere, drojdie de bere) şi pentru extragerea din culturile lor a unor vitamine din grupul B (B_1 şi B_2) şi a provitaminei D (ergosterol).

2. MUCEGAIURILE

Mucegaiurile sînt fungi filamentoşi care se reproduc prin spori asexuaţi şi sexuaţi şi sînt răspîndiţi pretutindeni în natură — în apă, aer şi sol — ca saprofiţi pe substanţa organică în descompunere şi ca paraziţi la plante şi animale. Ei au o capacitate foarte mare de adaptare la condiţii variate, nefavorabile în general pentru alte microorganisme (aciditate, presiune osmotică mare, uscăciune etc.). Ca toate ciupercile, mucegaiurile sînt *plante fără clorofilă,* cu structură celulară de tip eucariot (tab. 18).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 18

CARACTERE DIFERENŢIALE ALE BACTERIILOR ŞI FUNGILOR

	Bacterii	Fungi
Tipul de organizare celulară	Procariot	Eucariot
Volumul celulei	1 – 5 μ^3	Levuri — 20—50 μ^3; mucegaiuri — mult mai mare, greu de definit
Perete celular	Acid muramic, la care se adaugă acizi teichoici şi, la unele grupe, acid diaminopimelic	Glucan, manan, chitină, complexe glucan — şi manan-proteină
Membrană citoplasmatică	Nu conţin steroli (excepţie *Mycoplasma* cultivată pe steroli)	Conţine steroli
Nucleu	Nucleoid; absenţa membranei nucleare	Nucleu Prezenţa membranei nucleare
Citoplasmă	Absenţa mitocondriilor şi a reticulului endoplasmic	Prezenţa mitocondriilor şi a reticulului endoplasmic
Metabolism	Autotrofe sau heterotrofe aerobe, obligat şi facultativ anaerobe	Heterotrofe; aerobe sau facultativ anaerobe Absenţa autotrofilor şi a anaerobilor
Sensibilitate la fag	Prezentă (bacteriofagi)	Nedemonstrată fără echivoc
Dimorfism	Absent	Caracteristic pentru unele specii
Sensibilitate la antibiotice şi substanţe chimioterapice	Sensibile la antibiotice antibacteriene (penicilină, streptomicină, tetracicline etc.); rezistent la antifungice	Sensibile la antibiotice de tip special; rezistente la sulfamide şi antibiotice antibacteriene

Corpul lor este constituit dintr-un t a l, adică dintr-o masă vegetală neregulată în care nu se diferenţiază rădăcini, tulpini şi frunze, şi se formează prin creşterea împreună a numeroase filamente lungi şi subţiri numite *hife*, al căror ansamblu reprezintă un miceliu. În dezvoltarea mucegaiurilor se recunosc două faze (R a p e r şi E s s e r): *1) faza vegetativă*, reprezentată în majoritatea cazurilor dintr-un sistem hifal sau micelian în care diferenţierile structurale sau funcţionale sînt absente sau minime; 2) *faza reproducătoare*, caracterizată prin formarea unor elemente de reproducere asexuată sau sexuată, adesea cu un înalt grad de diferenţiere şi variind ca dimensiuni de la microscopic la macroscopic şi ca durabilitate de la efemer la peren. Reproducerea poate începe de timpuriu şi, în acest caz, ea poate să coincidă cu cea mai mare parte a existenţei vegetative, ori poate să se producă tardiv sau chiar după ce activitatea vegetativă a încetat.

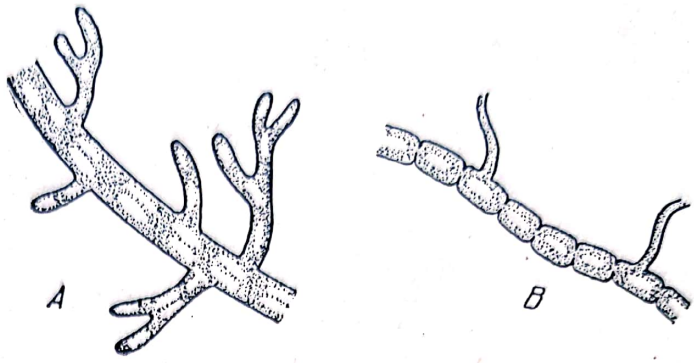


Fig. 250. Tipuri de micelii fungice:

A — miceliu neseptat sau coenocitic (*Phycomycetes*); *B* — miceliu septat, cu pereţi despărţitori incompleţi (*Ascomycetes*).

a. Organizare celulară

Hifele care alcătuiesc miceliile constau fie din celule alungite alipite cap la cap (*miceliu septat*), fie dintr-o celulă unică, mult alungită şi ramificată, reprezentînd un tub continuu nedivizat prin septuri (*miceliu coenocitic*).

Organizarea coenocitică a miceliului este tipică la *Phycomycetes*, în ale căror hife se găsesc numeroşi nuclei răspîndiţi la întîmplare într-o masă continuă de citoplasmă comună. Septurile lipsesc complet sau apar numai în hifele bătrîne, la care delimitează elementele reproducătoare sau separă părţile moarte ori lezate ale hifei.

Morfologia hifelor variază foarte mult între două extreme. La una dintre ele, corespunzînd formelor acvatice, tot miceliul este constituit dintr-o „celulă" unică multinucleată, care la maturitate se transformă în întregime într-un corp reproducător, fie asexuat, fie sexuat. La cealaltă extremă se găsesc mucegaiuri (de exemplu, ordinul *Mucorales*), la care corpul vegetativ este un miceliu extrem de ramificat, capabil de creştere luxuriantă, din care iau naştere elemente reproducătoare cu un înalt grad de diferenţiere. La cele mai multe forme din acest grup miceliul vegetativ este diferenţiat obligatoriu sau facultativ în două porţiuni: *1*) *sistemul rizoial* — alcă-

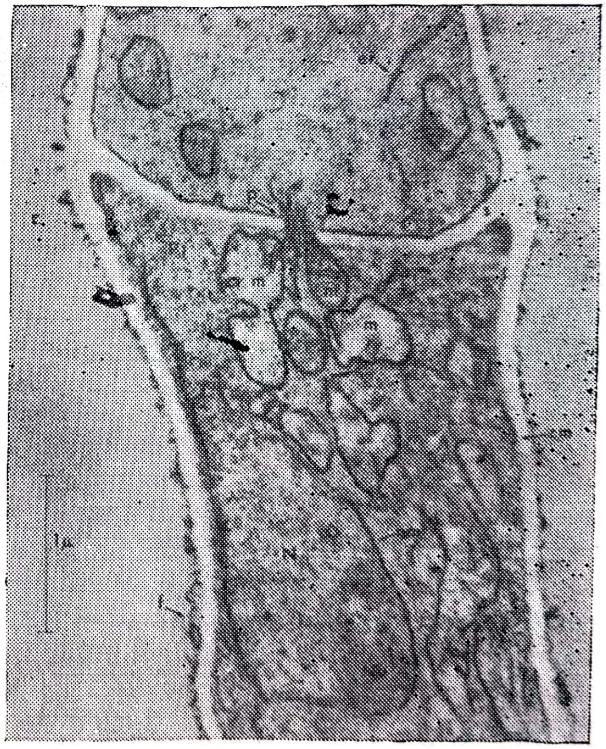


Fig. 251. Natura coenocitică a hifelor la *Neurospora crassa:*

m — mitocondrie traversînd porul septului despărţitor (*S*); *w* — perete celular cu învelişul său extern (*f*); *cm* — membrana citoplasmatică; *N* — nucleu; *Nu* — nucleul; *nm* — membrana nucleară; *pr* — ribosomi; *er* — reticul endoplasmic (după Shatkin).

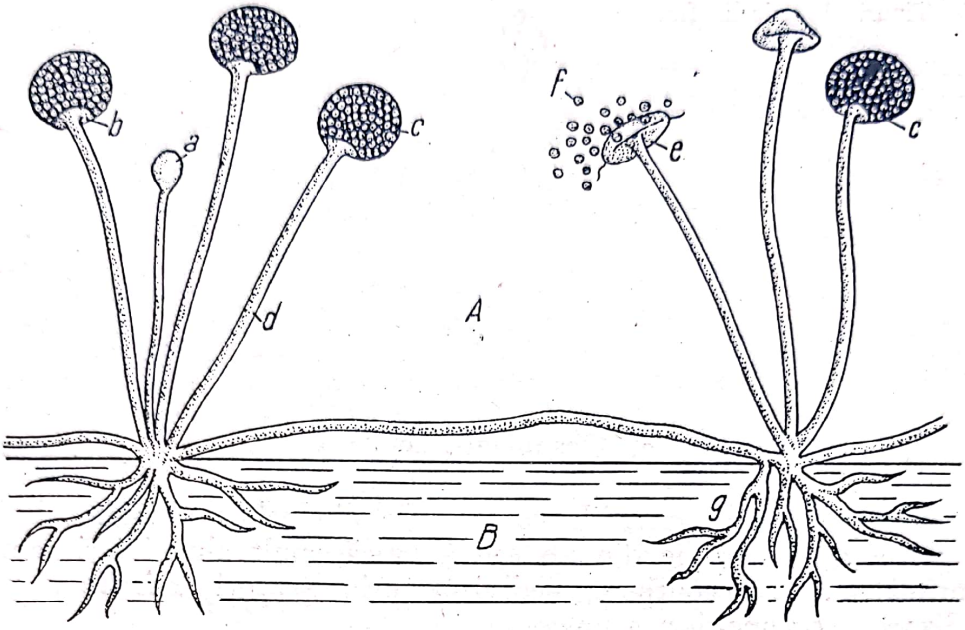


Fig. 252. *Rhizopus nigricans:*

A — miceliu reproducător: *a* — sporange imatur; *b* — columela; *c* — sporange matur plin cu spori; *d* — hifă; *e* — sporange rupt; *f* — spori; *B* — miceliu vegetativ: *g* — rizoizi.

tuit din hife fine, bogat ramificate şi foarte efilate spre extremităţi, complet pătrunse în substrat şi 2) *porţiunea aeriană* alcătuită din hife lungi, mai puţin ramificate şi mai rezistente.

Rizoizii asigură fixarea de substrat a miceliului şi absorbţia apei şi a substanţei nutritive, iar miceliul aerian poartă pe el hifele fertile pe care se formează organele de reproducere.

Organizarea septată a hifelor este caracteristică mucegaiurilor mai evoluate, cum sînt cele din clasele *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* şi *Fungi imperfecti*. Structura lor este aceea a unor hife septate, la care septurile transversale delimitează celulele foarte diferite ca lungime şi lăţime. Dimensiunile medii ale acestor celule de formă cilindrică sînt, după Hawker, de 2—5 μ pentru diametru şi de 2—4 ori mai mult pentru lungime. Numărul nucleilor poate varia, dar el este relativ constant pentru o anumită specie şi pentru speciile înrudite. La unele specii, celulele sînt uninucleate, la altele sînt binucleate sau conţin uneori sute de nuclei într-o citoplasmă comună. În mod obişnuit, pereţii transversali nu sînt compleţi, ci prezintă un por central larg prin care se realizează o continuitate citoplasmatică de la o celulă la alta. Din cauza curenţilor citoplasmatici, prin aceşti pori trec de la o celulă la alta citoplasma şi chiar nucleii, deformaţi atunci cînd străbat porii şi recăpătîndu-şi forma iniţială o dată ajunşi în celula vecină. Această comportare face ca organizarea miceliilor septate să se asemene funcţional cu cea coenocitică. Prezenţa septului parţial conferă unele avantaje biologice, ţinînd de rigiditatea crescută a hifei şi de faptul că „repararea" hifelor lezate prin fragmentarea miceliului se face mai uşor prin simpla astupare a porului septal decît prin formarea unui sept complet.

b. Structură internă

Hifele sînt delimitate la exterior de un perete celular rigid, care conţine *chitină*. El acoperă o membrană citoplasmatică intim aderentă de citoplasmă, care se prezintă sub forma unei mase fin granulare în care sînt suspendate vacuole, picături de grăsime, numeroase granule de incluziuni şi particule. În citoplasmă se găseşte, de asemenea, un reticul endoplasmic constînd dintr-un sistem de tubi interconectaţi şi de vezicule legate prin membrane. Nucleul, de obicei sferic sau ovoid, are diametrul de 1—3 μ. El este separat de citoplasmă printr-o membrană nucleară alcătuită din două straturi şi perforată din loc în loc de pori cu Ø 50 mμ, ca şi membrana nucleară a plantelor superioare şi a animalelor. În interiorul lui se găseşte nucleoplasma, uneori fină, reticulată, şi unul sau mai mulţi nuclei dispuşi central, excentric sau lateral. Numărul cromozomilor variază dar el este în general mic: de obicei 4 la *Ascomycetes* şi 2 în nucleii somatici, la *Basidiomycetes*.

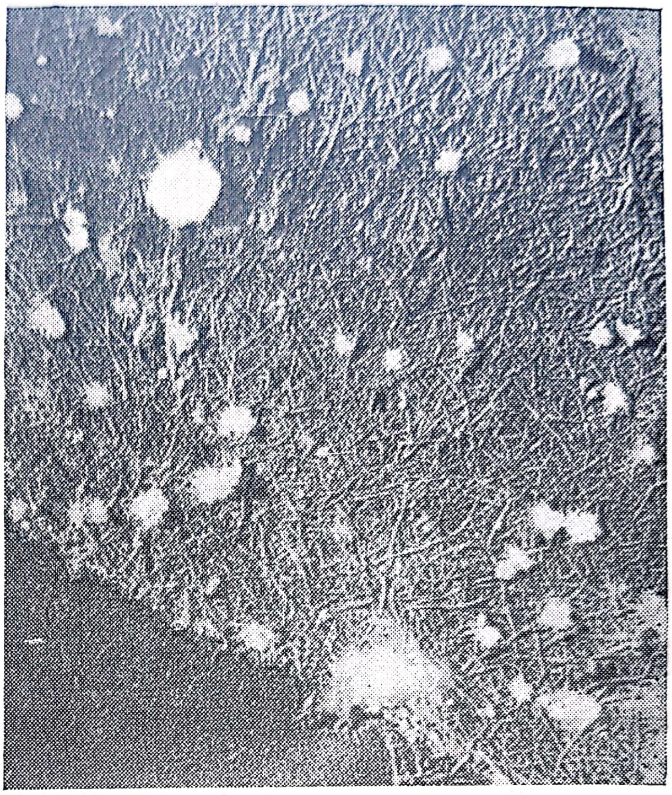


Fig. 253. Structura microfibrilară (fibrile de chitină) a peretelui celular la *Phycomycetes* (după Aronson).

c. Metabolism

Mucegaiurile sînt organisme vegetale heterotrofe — incapabile de fotosinteză, care se dezvoltă bine în medii bogate în substanţe organice. De obicei ele utilizează ca sursă de carbon diferite glucide, alcooli şi acizi organici, iar ca sursă de azot compuşi organici (peptone, aminoacizi) şi uneori săruri de amoniu şi nitraţi.

Mucegaiurile cresc bine în atmosferă umedă, iar *p*H-ul lor optim este de 5—6 (variaţiile tolerate fiind cuprinse între *p*H 2 şi *p*H 9,6). Unele specii cresc în aced acetic 1N sau $H_2SO_{42}N$, hrănindu-se pe seama impurităţilor din soluţie. Ele au capacităţi foarte mari şi variate de sinteză, putînd forma în cursul metabolismului lor polizaharide, lipide, acizi organici, pigmenţi, substanţe antibiotice şi substanţe celulare cu înaltă valoare nutritivă, care rămîn localizate în miceliu sau sînt eliminate în mediu. Temperatura lor optimă de

dezvoltare este de 22—32°C, cea minimă de 5—10°C şi cea maximă de 30—40°C. Aproape toţi reprezentanţii grupului sînt aerobi şi, ca atare, au nevoie de prezenţa unei concentraţii ridicate de O_2.

d. Dinamica procesului de creştere

Creşterea mucegaiurilor poate fi studiată depunînd în zona centrală a unei plăci Petri, cu un mediu adecvat, cîţiva spori sau o porţiune de miceliu fungic. Creşterea este limitată în mod caracteristic la extremitatea liberă a hifelor. Ea poate continua prin extinderea hifelor periferice, atîta timp cît mediul conţine substanţe nutritive. Procesul a fost urmărit mai în amănunt la miceliile septate, deşi acelaşi principiu se aplică şi celor coenocitice. După alungirea celulei terminale şi biosinteza de perete celular, urmează procesul de formare a septului transversal, avînd ca rezultat delimitarea a două celule-fiice. Cea apicală continuă ciclul de creştere şi diviziune, pe cînd celula subterminală participă doar facultativ la creştere, şi anume numai atunci cînd produce o ramificaţie laterală, dotată, la rîndul ei, cu capacitatea de creştere apicală şi de diviziune. În unele cazuri (la unele *Basidiomycete*) un singur miceliu poate atinge pînă la 15 metri. Pe măsură ce miceliul creşte la periferie, conţinutul citoplasmei poate să dispară în partea centrală, cea mai veche a coloniei. Creşterea unui miceliu pornind de la un inocul de spori sau de la un fragment micelian parcurge mai multe faze:

Faza iniţială de lag, care durează cîteva ore, este caracterizată nu prin fenomene de creştere, ci prin procesele de germinare a sporilor sau de regenerare a hifelor rupte şi lezate care au servit ca inocul.

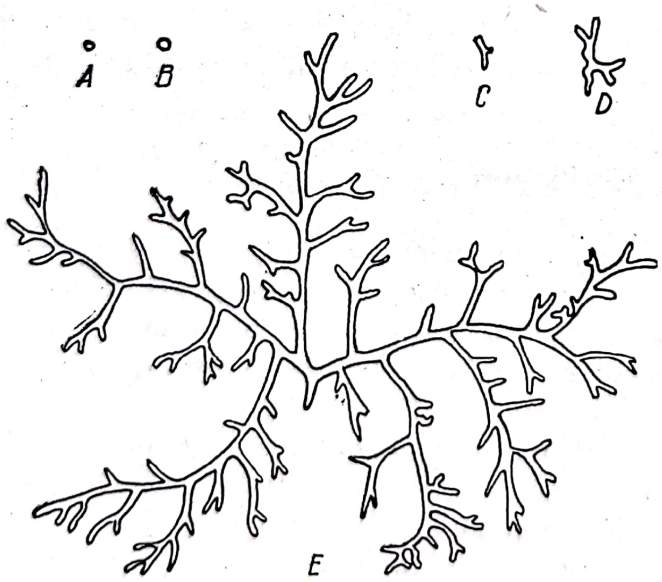


Fig. 254. Etapele succesive (*A—E*) ale dezvoltării unui miceliu fungic pornind de la o celulă reproducătoare sau de la o conidie (după Ingold).

Faza de creştere liniară corespunde perioadei în care pe suprafaţa mediului apare o colonie circulară care creşte liniar în raport cu timpul. Viteza de creştere se menţine constantă la marginea coloniei, în timp ce în zona ei centrală creşterea este mai lentă sau chiar încetează. Creşterea coloniei în suprafaţă nu este corelată cu creşterea ei în greutate. În medii sărace în substanţe nutritive, colonia se extinde mai repede, însă sub forma unei reţele fine de hife, în timp ce pe medii bogate, creşterea ei în diametru este mai lentă dar miceliul format este mai gros.

Faza de învechire se traduce prin încetinirea vitezei de creştere, pe măsură ce colonia se apropie mai mult sau mai puţin de bariera mecanică reprezentată de marginea plăcii Petri, dar ea este de fapt determinată de efectul dăunător al produşilor de metabolism liberaţi din colonie. La unele specii ea se însoţeşte de liza miceliului în centrul coloniei. Încetinirea ritmului de creştere apare mai repede cînd cultura se dezvoltă în medii bogate în substanţe nutritive şi la temperaturi optime şi supraoptimale, acumularea produşilor de metabolism făcîndu-se mai rapid în aceste condiţii.

Creşterea coloniilor de mucegai pe medii solide evoluează cu o viteză variabilă în funcţie de tulpină, mediul de cultură şi factorii de mediu (t°,*p*H, presiune osmotică etc.). La fungii neseptaţi, alungirea miceliului poate ajunge la 3 mm pe oră la 25°C, astfel că în 2—3 zile colonia poate acoperi o zonă mare cît suprafaţa unei portocale. În medii lichide, fungii produc o „pînză" miceliană la suprafaţa lichidului, astfel că diferitele părţi ale culturii se găsesc în condiţii diferite de mediu, în special sub raportul gradului de aerobioză. De aceea, în procesele industriale în care este necesară o dezvoltare abundentă şi egală a mucegaiului se caută să se asigure condiţii fiziologice omogene de cultivare prin agitare mecanică şi aerare controlată a mediului. În aceste condiţii se realizează o dispersare a miceliului însoţită de apariţia unor colonii sferice.

e. Reproducere

Procesul de reproducere se manifestă în forme diferite, care au însă unele trăsături comune. În anumite faze ale creşterii hifelor survine o modificare morfologică în urma căreia apar hife specializate, care participă la reproducere prin formarea de spori. Aceştia pot fi de două tipuri: *1) spori sexuaţi*, rezultaţi direct sau indirect dintr-un proces de încrucişare între două celule polarizate sexual, însoţit de transfer cromozomic şi recombinare genetică şi 2) *spori asexuaţi*, care se formează prin simplă derivare din celule vegetative mai mult sau mai puţin specializate. După locul lor de formare sporii pot fi e n d o g e n i (endosporii), dacă apar în interiorul unor celule sau organe sporogene, aşa cum sînt *zoosporii, sporangiosporii* şi *ascosporii*, sau e x o g e n i (exosporii) dacă se diferenţiază extracelular pe suporturi speciale reprezentate de conidiofori şi basidii ca în cazul *conidiilor* şi al *basidiosporilor*.

Sporii sexuaţi, care apar în stadiul denumit „perfect" al fungilor, se formează prin fuziunea a doi gameţi de dimensiuni egale (izogami) sau inegale (eterogami) sau prin diviziunea după o perioadă de creştere secundară, a unei celule rezultată dintr-o astfel de fuzionare. Ei au în general un perete gros şi reprezintă de obicei forme de rezistenţă a organismului la condiţii de mediu defavorabile şi forme care asigură diseminarea şi supravieţuirea speciei. Sporii sexuaţi au un rol important în procesul de evoluţie a fungilor, prin aceea că, rezultaţi din procese de recombinare genetică, ei au descendenţi mai bine înzestraţi ca posibilităţi de adaptare, întrucît posedă caractere combinate provenite de la fiecare din ascendenţii celulei sporale. Sub acţiunea selectivă a me-

diului, formele slab adaptate sînt eliminate, în timp ce acelea care sînt mai bine adaptate şi au o capacitate superioară de supravieţuire se menţin şi se multiplică în natură.

Sporii asexuaţi iau naştere în aşa-numitul stadiu „imperfect" al fungilor, prin segmentarea unei hife specializate care poate fi pur şi simplu o hifă izolată de restul miceliului sau o hifă modificată în mod caracteristic pentru a forma corpi reproducători de un anumit tip. În mod obişnuit, înmulţirea prin spori asexuaţi este forma frecventă de reproducere a mucegaiurilor în condiţii favorabile de mediu. Acest tip de spori se formează în număr mare, uneori de ordinul miilor, şi servesc atît la multiplicare cît şi la dispersarea speciei în natură, deoarece sînt mici, uşor antrenaţi de vînt şi rezistenţi, graţie unui perete sporal uneori destul de gros. La fungii lipsiţi de forma de reproducere sexuată, denumiţi fungi imperfecţi şi alcătuind un grup sistematic izolat, foarte eterogen, multiplicarea prin spori asexuaţi reprezintă unica formă de reproducere a speciei.

Sporii mucegaiurilor sînt în general colorati şi, ca atare, dau miceliilor bătrîne în zona centrală a coloniei o culoare caracteristică, în timp ce zona ei periferică, la nivelul căreia creşterea vegetativă continuă încă, rămîne albă sau albă-cenuşie. Ei sînt uşor detaşabili de ţesutul parental, iar în natură sînt uneori răspîndiţi la distanţe mari prin mecanisme speciale, adesea complicate. Numai relativ puţini întîlnesc însă condiţii favorabile de mediu şi pot să germineze. Sporii adaptaţi să trăiască în medii umede sînt mobili şi se deplasează autonom în lichide, înainte de a se depune pe un substrat pentru a germina. La unele specii, ei sînt uniformi şi caracteristici, ca mărime şi structură, aspectul lor putînd servi drept criteriu taxonomic.

Peretele sporal este unic sau dublu, alcătuit în acest din urmă caz din *epispor* la exterior şi *endospor* la interior, acoperind citoplasma, iar ca aspect este perfect neted sau poate avea mici adîncituri ori, dimpotrivă, numeroase proeminenţe mărunte.

Compoziţia chimică a sporului este asemănătoare aceleia a hifei de origine: în raport cu greutatea uscată, el conţine 20—35% glucide, 12—35% lipide şi 25—30% proteine. Sporul fungic conţine şi enzime, în special pe cele implicate în catabolismul glucozei şi în respiraţie. Majoritatea enzimelor sînt localizate în interiorul celulei sporale, sub formă de coloizi în suspensie apoasă sau în asociaţie mai intimă cu fracţiuni celulare particulare, cum ar fi mitocondriile şi numai cîteva enzime sînt legate de formaţiunile structurale de suprafaţă ale sporului. Imediat după ce s-au format, precum şi în cursul perioadei de răspîndire, sporii fungilor au o viaţă latentă din punct de vedere fiziologic: creşterea este nulă, iar activitatea metabolică este extrem de redusă. În acest stadiu de latenţă ei au o rezistenţă crescută la uscăciune, presiune osmotică, temperatură şi iradiere cu raze ultraviolete.

Sporii asexuaţi. Această categorie de spori, cea mai frecvent observată la mucegaiuri, este reprezentată prin cîteva tipuri caracteristice, care pot fi mai mult sau mai puţin diferenţiate prin particularităţi de detaliu în funcţie de specie.

1) *Zoosporii* sau *planosporii*, reprezentînd cel mai simplu tip de spor asexuat, se formează în celule speciale saciforme, numite zoosporangi, din care se eliberează prin ruperea peretelui sporangial sau prin traversarea porilor apăruţi secundar în structura acestuia. Formele lor sînt diverse: sferică, ovoidală, piriformă sau reniformă. Ei au iniţial o fază mobilă, în care, lipsiţi de perete celular, se deplasează în medii lichide cu ajutorul unor cili în număr şi cu aranjare constante, după care îşi pierd flagelii şi se închistează, înconjurîndu-se de un perete celular protector, care subsistă atîta timp cît condiţiile de mediu nu sînt favorabile germinării. Acest tip de spori este întîlnit la specii din clasele *Archimycetes* şi *Phycomycetes*.

2) *Sporangiosporii* sau *aplanosporii* apar într-un sporangiu care se constituie ca o umflătură la capătul rotunjit al unei hife fertile denumită *sporangiofor*. După ce extremitatea hifei s-a lărgit pentru a forma sporangele, apare un sept care o separă de restul hifei. Capătul de hifă rotunjit în formă de măciucă, pe care se găseşte sporangele şi care este în parte acoperit de acesta, constituie *columela*. Îndată ce sporangele s-a format, nucleul său se divide de mai multe ori, după care fiecare dintre nucleii-fii îşi delimitează cîte o masă perinucleară de citoplasmă proprie prin formarea unui perete celular, căpătînd astfel morfologia tipică de spor. Sporangiul umplut cu spori se poate deschide spontan prin explozie sau poate fi rupt în urma unui contact din exterior, eliberînd sporii care se răspîndesc în natură. Multiplicarea prin sporangiospori este caracteristică pentru fungii neseptaţi (*Phycomycetes*), ca de exemplu *Rhizopus nigricans*.

3) *Conidiile* sau *conidiosporii* sînt spori expuşi de la început contactului cu mediul extern, nefiind protejaţi de un sporange deoarece sînt aşezaţi la extremităţile unor hife fertile numite *conidiofori*. Capetele conidioforilor se diferenţiază sub formă de celule speciale, cu aspectul unor umflături, pe care sînt aşezate celulele denumite *sterigme*, din care derivă conidiile. De obicei sterigma se strangulează liberînd conidiile una după alta, astfel că fiecare conidie nou formată împinge înaintea ei pe cea precedentă, ceea ce face ca şirul lor să alcătuiască un lanţ în care conidia cea mai bătrînă — cea care a apărut prima — ajunge să fie localizată la capătul lui distal. La unele specii, conidia o dată formată eliberează ea însăşi un mugure care creşte şi devine, la rîndul său, o conidie capabilă de înmugurire. Înmugurirea în continuare a conidiilor terminale determină şi ea formarea unor lanţuri conidiale, la al căror capăt este însă situată de astă dată conidia cea mai tînără. Reproducerea prin conidii este caracteristică pentru *Ascomycetes* (de exemplu, *Aspergillus*) şi pentru mulţi fungi imperfecţi.

4) *Chlamidosporii* iau naştere prin dezvoltarea unui perete gros în jurul unei celule din miceliu. Ei conţin substanţe de rezervă şi au o mare rezistenţă la uscăciune, în timpul căreia pot rămîne în stare de latenţă chiar o perioadă îndelungată. Chlamidosporii pot fi produşi de toate mucegaiurile.

5) *Oidiile* sau *artrosporii* se formează la mucegaiurile septate prin fragmentarea în celulele componente a unor hife vegetative terminale. Aceşti spori nu au o rezistenţă mare la uscăciune şi par să nu fie analogi funcţional cu

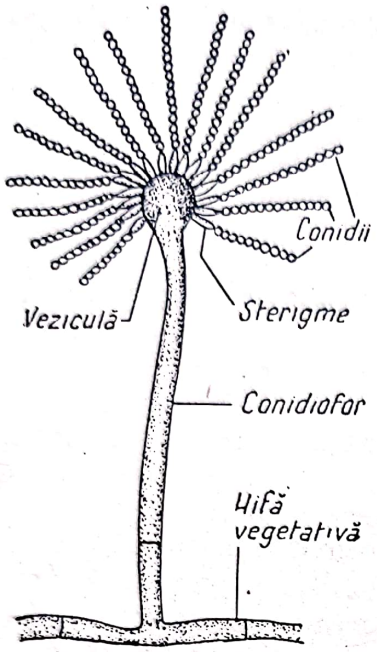


Fig. 255. Mucegai din genul *Aspergillus* — reprezentare schematică a unei hife vegetative care poartă o hifă fertilă pe care se formează conidii.

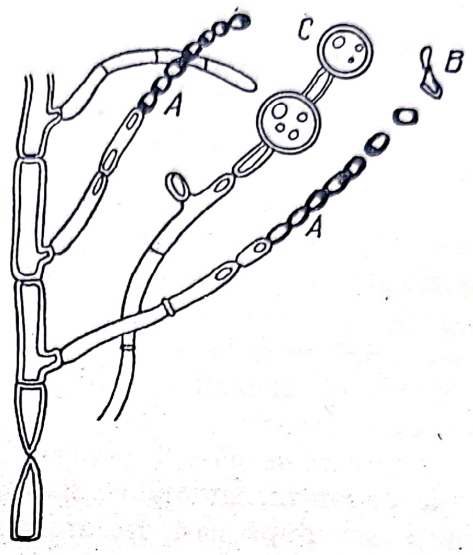


Fig. 256. *Geotrichum:* segmentarea hifelor terminale pentru a forma artrospori (*A*) şi modul de formare al chlamidosporilor (*C*); *B* — artrospor pe cale de germinare.

sporangiosporii şi conidiile. În condiţii favorabile, ei dau naştere unui miceliu nou.

Sporii sexuaţi sînt mai puţin frecvent întîlniţi decît cei asexuaţi, deoarece reproducerea pe cale sexuată are loc numai în anumite condiţii de mediu. În funcţie de modul lor de formare, ei se pot împărţi în mai multe tipuri:

1) *Ascosporii* iau naştere prin fuzionarea a două prelungiri tubulare emise de două celule vecine de pe acelaşi miceliu sau după micelii separate. Nucleii

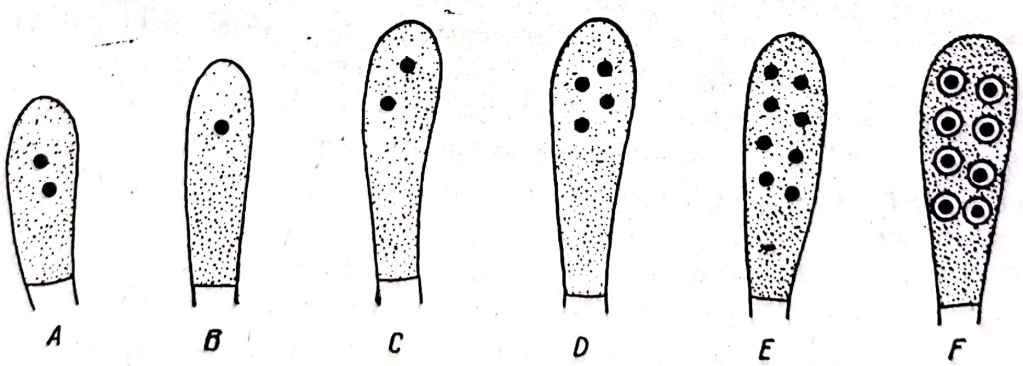


Fig. 257. Formarea ascosporului la mucegaiuri. În celula binucleară (*A*) produsă prin fuzionarea a două celule din acelaşi miceliu sau din micelii diferite, nucleii se unesc (*B*), se divid repetat (*C* şi *D*) formînd 8 nuclei sporali (*E*). Ulterior apar pereţii sporilor (*F*) care sînt conţinuţi într-o celulă numită ască.

celulelor fuzionate se contopesc, astfel că celula formată prin fuziune devine un zigot, după care nucleul unic astfel rezultat suferă una pînă la trei diviziuni. Apoi, fiecare dintre nucleii-fii apăruţi prin diviziune se înconjură cu un strat dens de citoplasmă şi cu un perete celular pentru a forma cîte un spor. O dată constituiţi, sporii rămîn mai departe pentru un timp în celula de origine rezultată din procesul sexual, care este denumită a s c ă din cauza formei ei de sac.

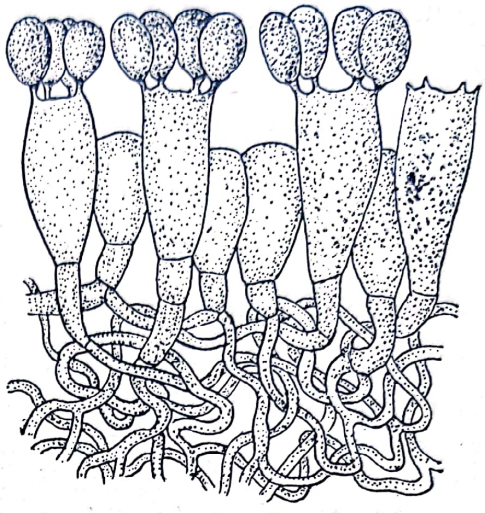


Fig. 258. Morfologia sporilor la *Basidiomycetes.* Desenul reprezintă o porţiune din suprafaţa uneia dintre lamele, mult mărită, în care se observă mai multe bazidii pe care se formează cîte patru bazidiospori legaţi de bazidie prin mici sterigme. Sporii bazidiei din dreapta s-au desprins şi s-au împrăştiat (după Jinnot).

2) *Bazidiosporii,* caracteristici ciupercilor din clasa *Basidiomycetes* se formează la exteriorul unui organ specializat numit bazidie. La origine, o bazidie constă din extremitatea unei hife unde se diferenţiază o celulă binucleată a cărei creştere dă bazidiei o formă caracteristică de măciucă. Cei doi nuclei ai unei asemenea celule fuzionează la un moment dat, formînd un nucleu unic diploid. Acest nucleu se divide apoi de două ori, ceea ce are ca urmare apariţia a patru nuclei-fii haploizi. În partea apicală a bazidiei se formează apoi patru mici proiecţii, denumite *sterigme,* care se alungesc terminal şi se lăţesc. În fiecare dintre sterigme trece cîte unul dintre cei patru nuclei haploizi ai bazidiei, pentru a forma bazidiosporii care, la maturare, sînt eliberaţi. Bazidia este întrucîtva similară unei asce, dar, spre deosebire de aceasta, îşi poartă sporii nu în interiorul, ci la exteriorul ei. O bazidie matură are la suprafaţa ei patru bazidiospori. Pentru eliberarea acestora, la nivelul pedunculilor lor de legătură cu bazidia apare cîte o picătură de lichid care creşte

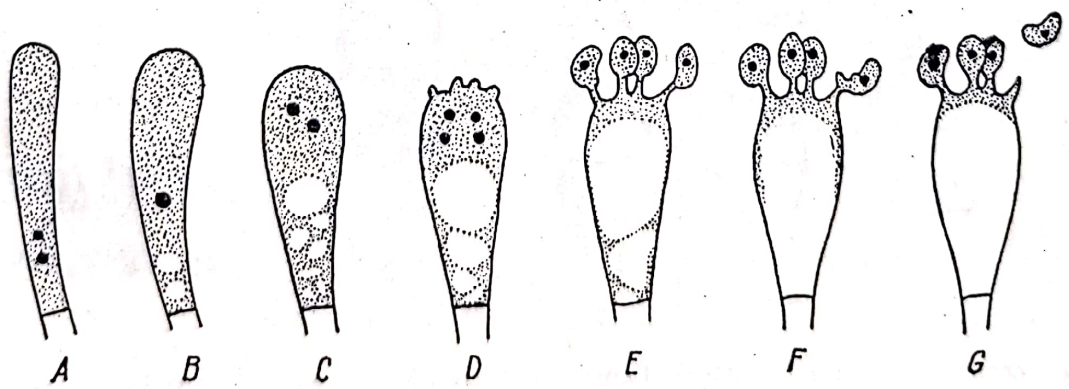


Fig. 259. Etapele succesive ale formării unei bazidii şi liberarea bazidiosporilor: *A* — celula binucleată; *B* — fuziunea nucleilor; *C* şi *D* — diviziunea nucleară; *E* — formarea bazidiosporilor; *F* şi *G* — liberarea lor (după Stanier).

treptat, pînă la aproximativ 1/5 din volumul sporului şi care, prin presiunea pe care o exercită, ajunge la un moment dat să proecteze cu putere sporul în aer.

3) *Oosporii* se formează la unele *Phycomycetes* prin unirea unei celule mici reprezentînd gametul mascul (♂) cu o celulă mare — gametul femel (♀) — diferenţiate pe hife vecine. Peretele lor este gros, ceea ce le conferă o rezistenţă foarte mare la uscăciune, astfel că se pot menţine mult timp în stare de latenţă.

4) *Zigosporii* apar la unele *Phycomycetes* (de exemplu la *Rhizopus nigricans*) în urma unirii a două celule aparent identice, provenind din hife homotalice (de la aceeaşi plantă), sau heterotalice, aparţinînd unor taluri diferite; în acest ultim caz, conjugarea se produce între hife derivate din taluri de tip sexual opus (+ şi —). Cele două hife denumite gametangii se întîlnesc, se apropie şi produc celule sexuale de tip special, care fuzionează şi formează un zigospor acoperit cu un perete protector, gros, de culoare neagră. Zigosporii pot rămîne vreme îndelungată în stare latentă. Ajunşi în condiţii de mediu favorabile, ei germinează şi produc un corp fructifer tipic asexuat.

Germinarea sporului. Cea mai importantă modificare survenind în cursul trecerii de la stadiul de latenţă sporal la cel vegetativ constă în umflarea sporului aflat în condiţii favorabile de mediu (mărirea sa echivalînd uneori, în aceste condiţii, cu de 8 ori volumul iniţial), urmată de apariţia unei mici umflături parietale şi ruperea peretelui sporal la acest nivel. Aceasta permite extruzia parţială a conţinutului celular sub forma unei protuberanţe ovalare, care prin creştere longitudinală devine tubul germinativ filamentos, reprezentînd originea hifei vegetative. Iniţial s-a crezut că germinarea sporului s-ar explica exclusiv prin hidratarea lui care provoacă mărirea volumului celular

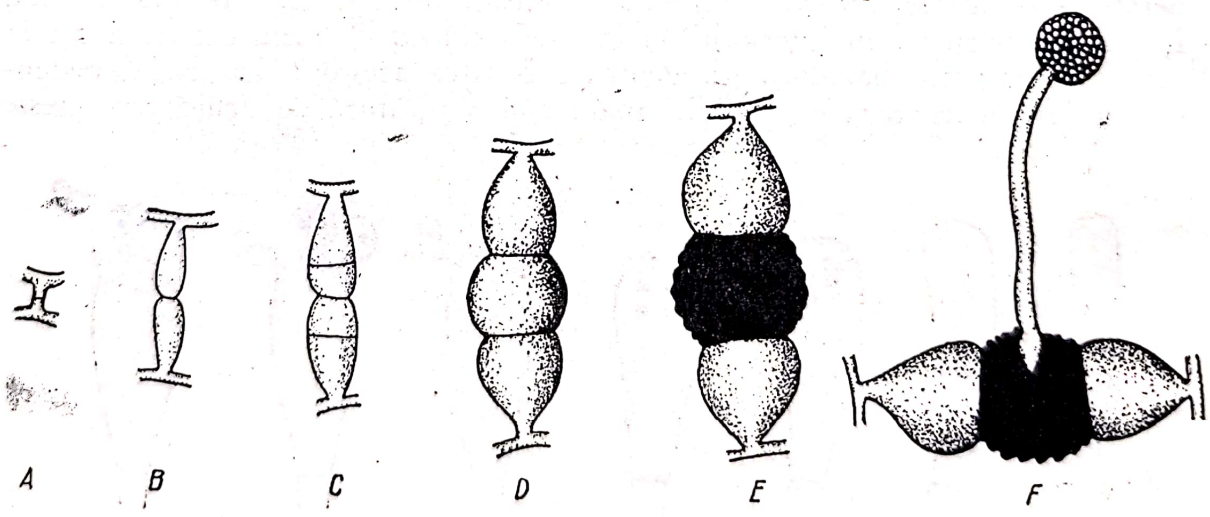


Fig. 260. Sexualitatea la *Rhizopus*. Etapele succesive ale procesului de formare a unui zigospor. Două celule din acelaşi miceliu sau din micelii diferite se întîlnesc (*A*, *B*), produc celule sexuale speciale (*C*) care fuzionează (*D*) şi formează un zigospor acoperit cu un perete protector, negru (*E*) care rămîne în stare latentă pînă la germinare, cînd formează un corp fructifer de tip asexuat (*F*).

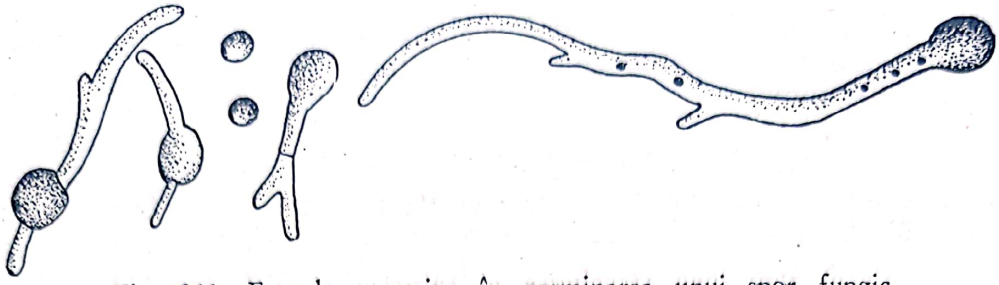


Fig. 261. Etapele succesive în germinarea unui spor fungic.

şi creşterea presiunii interne antrenînd ruperea peretelui sporal. Ulterior s-a demonstrat însă că aceste modificări morfologice sînt în realitate corelate cu declanşarea unor transformări fiziologice profunde (iniţierea sintezei de acizi nucleici, aminoacizi şi proteine, creşterea consumului de oxigen), corespunzînd trecerii de la stadiul de viaţă latentă caracterizat printr-un nivel extrem de scăzut al proceselor metabolice, la stadiul de vegetaţie condiţionat de o activitate metabolică intensă. Formarea tubului germinativ reprezintă tocmai indiciul exterior, foarte evident, al acestei schimbări fundamentale a intensităţii şi caracteristicilor calitative ale metabolismului celular.

f. Taxonomie

Mucegaiurile fac parte din phyllum *Mycophyta* sau *Fungi* şi reprezintă, împreună cu levurile, un grup incluzînd aproximativ 100—200 000 de specii (tab. 19).

Datorită numărului mare de specii şi polimorfismului lor marcat, mucegaiurile nu au pînă acum o clasificare corespunzătoare, bazată pe criterii care să întrunească acordul unanim al specialiştilor. După H a w k e r, ele se pot împărţi în patru clase: I. *Phycomycetes*, fungi inferiori cu miceliu vegetativ tipic neseptat. II. *Ascomycetes*, fungi mai evoluaţi care posedă, cu excepţia levurilor, un miceliu ramificat cu hife septate şi care se reproduc pe cale ase-

PRINCIPALELE CLASE DE FUNGI (după D a v i s) *TABELUL 19*

Clasa	Grupurile caracteristice	Miceliul	Sporii asexuaţi	Sporii sexuaţi
Phycomycetes	*Rhizopus, Mucor*	Neseptat	Endogeni	Anatomie variabilă
Ascomycetes	*Penicillium, Aspergillus, Levuri*	Septat	Exogeni [1]	Ascospori în saci sau asce
Basidiomycetes	*Agaricus, Puccinia*	Septat	Exogeni [1]	Basidiospori — pe suprafaţa basfidiei
Deuteromyces (Fungi imperfecţi)	*Microsporon, Trichophyton*	Septat	Exogeni [1]	Absenţi

[1] La extremităţile sau pe laturile hifelor.

xuată (în stadiul imperfect) prin conidii şi deseori pe cale sexuată (în stadiul perfect) prin ascospori. III. *Basidiomycetes*, fungii cei mai evoluaţi, cu miceliu bine dezvoltat şi înmulţire sexuată prin basidiospori. IV. *Fungi imperfecţi*, cu miceliu septat şi reproducere exclusiv asexuată, mai ales prin conidii; această ultimă clasă din sistemul lui Hawker nu reprezintă de fapt o unitate sistematică propriu-zisă, ci un grup eterogen alcătuit dintr-un număr mare (aproximativ 20 000) de specii diferite, cărora le lipseşte capacitatea de reproducere sexuată sau, cel puţin, la care nu s-au descris încă procese de sexualitate şi care, din această cauză, nu pot fi clasificate cu certitudine în nici una din celelalte clase.

În ultimele sisteme de clasificare (Grets şi Gäumann), ciupercile primitive endoparazite de tip intracelular sînt încadrate separat în clasa *Archimycetes*.

g. Răspîndire în natură şi importanţă

Mucegaiurile sînt foarte răspîndite în natură. Cele mai multe trăiesc ca saprofite în solul umed pe substanţe organice în curs de descompunere. Unele dintre ele sînt adaptate la mediul acvatic, trăind în apele dulci şi marine. În sfîrşit, unele mucegaiuri *(Peronosporaceae, Erysiphaceae, Uredinales)* sînt parazite obligate, dezvoltîndu-se numai pe seama ţesuturilor vii şi fiind incapabile să crească pe medii artificiale de laborator. Răspîndirea largă a mucegaiurilor în natură este favorizată de marea lor rezistenţă la condiţii ca aciditatea, uscăciunea, presiunea osmotică ridicată, în general nefavorabile pentru alte microorganisme, precum şi de faptul că toate tipurile de spori prezintă adaptări speciale pentru liberarea la distanţă şi pentru împrăştierea lor prin intermediul curenţilor de aer sau prin apă.

Unele mucegaiuri sînt patogene pentru plante, om şi animale, la care produc boli numite *micoze*. Altele *(Arthrobotrys robusta, Dactylaria gracilis)* sînt prădătoare, avînd capacitatea de a captura animale mici (nematode).

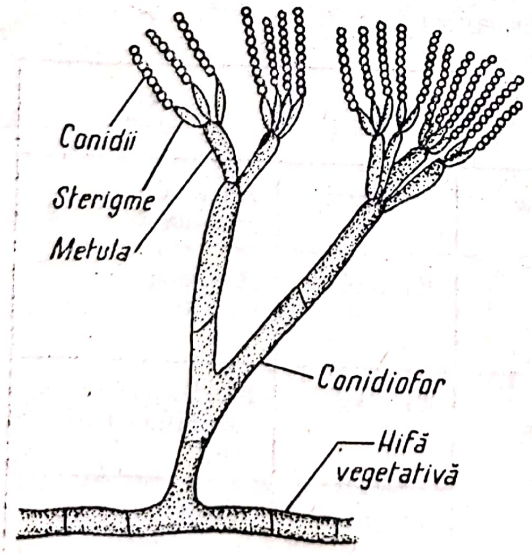


Fig. 262. Mucegai din genul *Penicillium*.

Unele specii de fungi (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. etc.) sînt folosite în industrie datorită capacităţii lor de a face biosinteza unor substanţe foarte utile în practică.

În sfîrşit, în afară de aceste acţiuni favorabile, levurile şi mucegaiurile pot contamina alimentele, descompunînd siropurile de zahăr, dulceţurile, fructele conservate, laptele condensat, untul, brînzeturile, făina, carnea conservată (chiar păstrată la frig) şi chiar murăturile. De asemenea, produc pagube însemnate prin degradarea pieilor, a hîrtiei (cărţi vechi şi documente de valoare), legături de cărţi etc.

NOŢIUNI DE GENETICĂ A MICROORGANISMELOR

Microorganismele în general — şi mai ales bacteriile şi virusurile — au rămas mult timp trecute cu vederea de geneticieni. Această situaţie se datora faptului că cele mai multe studii de genetică se bazau, în trecut, mai ales pe examinarea caracterelor organismelor hibride rezultate pe cale sexuată din încrucişarea a doi indivizi genetic diferiţi. Bacteriile, care se înmulţesc în general asexuat printr-o diviziune simplă, avînd ca rezultat formarea a doi indivizi absolut identici cu celula-mamă, nu ofereau un material experimental adecvat pentru un asemenea tip de cercetări; virusurile, entităţi la limita lumii vii, al căror mod de multiplicare a fost multă vreme necunoscut, erau încă mai puţin accesibile metodelor de studiu ale geneticii clasice. De abia după 1940, utilizarea microorganismelor ca *model experimental* în studiile de genetică a luat o extindere tot mai mare, ceea ce a dus la descoperiri de o importanţă covîrşitoare, care au revoluţionat concepţiile relative la variabilitatea organismelor şi la legile eredităţii.

Iradiind cu ultraviolete celule ale ascomicetei *Neurospora*, Beadle, apoi Beadle şi Tatum (1945) au obţinut tulpini mutante care, spre deosebire de tipul sălbatic iniţial, nu se mai puteau dezvolta pe medii sintetice cu compoziţie simplă decît dacă la aceste substrate se adăuga un anumit factor de creştere esenţial din categoria aminoacizilor, a vitaminelor, a purinelor sau a pirimidinelor. Peste 95% dintre mutantele astfel obţinute aveau deci un defect care le priva de capacitatea ca, pornind de la componentele simple ale mediului, să sintetizeze un anumit factor de creştere sau să-l elaboreze în cantitatea necesară proceselor lor vitale. Studiul activităţii enzimatice a acestor mutante a arătat că, de cele mai multe ori, ele nu mai dispuneau de o anumită enzimă fiindcă îşi pierduseră capacitatea de a o sintetiza, sau o elaborau în cantităţi insuficiente sau, în sfîrşit, sintetizau în locul ei o enzimă modificată, puţin activă ori uşor inactivabilă. Această deficienţă enzimatică explica pierderea aptitudinii de sinteză a factorului de creştere care, de aceea, trebuia adăugat în mediul de cultură cu compoziţie simplă.

Inducţia prin mutaţie a unui defect genetic unic care afectează sinteza unei singure enzime a impus deducţia că agentul mutagen — în cazul descris, radiaţiile — a acţionat la nivelul unei singure gene, aceea care controlează sinteza enzimei respective. S-a demonstrat astfel că de fiecare genă depinde în mod direct o reacţie biochimică specifică sau, după expresia cercetătorilor

Scanned with OKEN Scanner

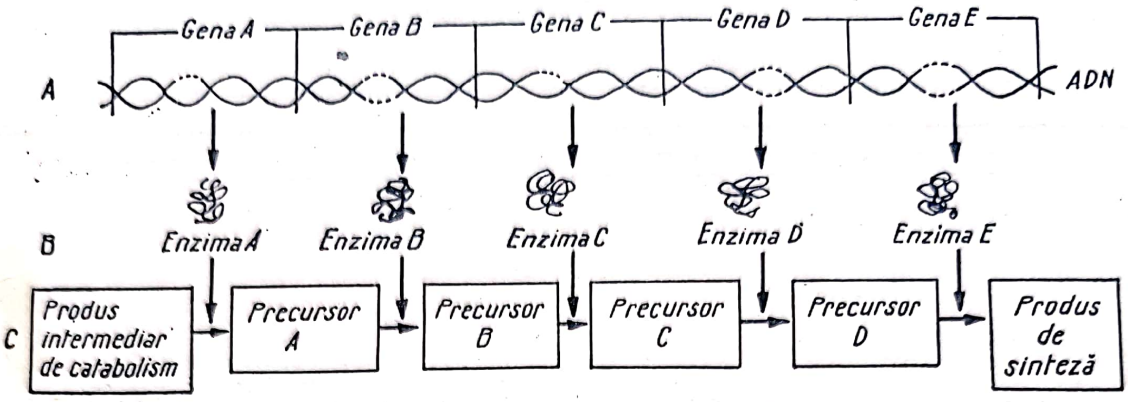


Fig. 263. Reprezentare schematică a concepţiei „o genă → o enzimă" a lui Beadle şi Tatum.

Beadle şi Tatum, „o genă → o enzimă" sau „o genă → o proteină". Cum ulterior s-a observat că în sinteza unor molecule de proteină pot fi uneori implicate mai multe gene, fiecare dintre ele controlînd sinteza unei părţi a acestor molecule complexe, formularea iniţială ar putea fi corectată în sensul „o genă → un lanţ polipeptidic".

Experienţele pe *Neurospora* ale lui Badle şi Tatum au dovedit că o genă poate să determine fie însăşi biosinteza unei proteine-enzimă, fie cantitatea în care aceasta este elaborată, fie calitatea sau activitatea ei, evidenţiată mai ales prin comportarea enzimei în funcţie de unele condiţii ale mediului ei de acţiune biologică. Tot prin experienţe efectuate pe microorganisme au fost realizate şi alte progrese importante în elucidarea mecanismelor de acţiune genetică la nivel subcelular. Identificarea ADN cu principiul capabil să inducă transformarea genetică a unui tip serologic de pneumococ în altul (Avery şi col., 1944), descoperirea conjugării la bacterii, precizarea cunoştinţelor relative la structura internă a virusurilor şi, mai ales, descifrarea relaţiei dintre bacteriofag şi celula bacteriană gazdă au contribuit în mare măsură la dezvoltarea cercetărilor moderne în acest domeniu.

Utilizarea microorganismelor ca model experimental în studiile de genetică are cîteva avantaje deosebit de preţioase, şi anume:

1) *Materialul genetic al bacteriilor şi al virusurilor este mult mai puţin complex din punct de vedere chimic*, fiind alcătuit exclusiv din acid nucleic, şi este structurat mai simplu decît genomul celulelor superior organizate. Pe de altă parte, bacteriile şi virusurile sînt în mod obişnuit haploide, ceea ce uşurează analiza genetică prin faptul că o genă mutantă se poate exprima fenotipic imediat, această exprimare nefiind dependentă, ca în cazul organismelor diploide, de caracterul dominant sau recesiv al mutaţiei. De asemenea, efectele fenotipice care decurg din încorporarea într-un genom a unei gene noi — prin transfer genetic şi recombinare — se manifestă fără complicaţiile care la organismele superioare ar fi inevitabile ca rezultat al morfogenezei şi

diferenţierii celulare. Analiza genetică este astfel uşurată, tehnici relativ simple permiţînd punerea selectivă în evidenţă a acţiunii unei singure gene.

2) *Microorganismele au exigenţe nutritive simple* şi, ca atare, pot fi cultivate pe medii de cultură artificiale, cu compoziţie chimică bine cunoscută, din care se pot izola cu uşurinţă enzimele şi produşii caracteristici de sinteză.

3) *Ritmul rapid de creştere şi multiplicare* al microorganismelor îngăduie urmărirea într-un timp scurt a unui mare număr de generaţii. Astfel, o tulpină bacteriană care se divide la fiecare 20 de minute parcurge o succesiune de 72 de generaţii în 24 de ore, interval de timp care în cazul unui număr identic de generaţii umane ar echivala cu aproape 2 000 de ani. Acest ritm de multiplicare este deosebit de rapid şi în raport cu acela al organismelor folosite curent în experienţele de genetică, aşa cum sînt, de exemplu, *Drosophila*, care are un ciclu vital de 14 zile, sau porumbul, care permite urmărirea a cel mult două generaţii pe an.

În ciuda particularităţilor specifice microorganismelor, natura materialului genetic, stabilitatea lui, transmiterea informaţiei genetice şi modul de control al proceselor intracelulare care condiţionează exprimarea caracterelor ereditare sînt similare la toate organismele. Ca urmare, principiile fundamentale ale geneticii se aplică în mod egal la animale şi la plante, la uni- şi la pluricelulare.

Folosirea microorganismelor ca material experimental în cercetările de genetică s-a dovedit de aceea perfect adecvată, întrucît permite studiul fenomenelor biologice la nivel celular şi subcelular, fără impedimentele legate de interacţiunile şi interdependenţele inerente organizării mult mai complexe a organismelor superioare. Pe această cale s-a putut stabili natura materialului genetic şi modul lui de replicare, a fost infirmată concepţia clasică a indivizibilităţii genei prin dovedirea existenţei unor unităţi infragenice cu funcţii distincte, a fost descifrat codul genetic (sistemul de codificare a informaţiei genetice) şi s-au elucidat numeroase probleme referitoare la circulaţia intracelulară a informaţiei ereditare, la utilizarea acestei informaţii în procesul de biosinteză a proteinelor, la reglarea genetică a tuturor proceselor metabolice etc.

Genetica microbiană a adus, de asemenea, o contribuţie imensă la naşterea, în jurul anului 1960, a *Biologiei moleculare*, orientare nou apărută la convergenţa unor ştiinţe biologice şi fizico-chimice, care are ca obiect interpretarea tuturor proprietăţilor fundamentale ale fiinţelor vii în raport cu structura şi funcţiile macromoleculelor de proteine şi acizi nucleici. Cercetări în acest sens efectuate cu ajutorul microorganismelor au adus numeroase date experimentale care au permis formularea celor două postulate fundamentale pentru noua orientare a gîndirii ştiinţifice în biologie, şi anume:

1) Toate *proprietăţile potenţiale* (ontogenetice, filogenetice şi adaptative) ale unui organism ţin de structura specifică a acidului nucleic alcătuind genomul său, care conţine şi transmite informaţia genetică necesară pentru sinteza atît a acizilor nucleici, cît şi a proteinelor organismului respectiv.

2) Toate *proprietăţile actuale* (biochimice, fiziologice şi structurale) ale unui organism sînt expresia integrată a structurii şi activităţii funcţionale a proteinelor sale, în special a proteinelor-enzime cu care este înzestrat.

1. ROLUL GENETIC AL ACIZILOR NUCLEICI

Mai multe fapte de observaţie au sugerat asocierea ADN cu funcţia de *purtător al informaţiei genetice*. Între acestea se pot cita: *a)* prezenţa lui constantă în toate celulele; *b)* distribuţia lui, obişnuit sub formă cromozomică, în cantitate fixă pentru o anumită celulă şi proporţională cu numărul cromozomilor ei; celulele haploide conţin numai jumătate din cantitatea de ADN existentă în celulele diploide, iar la acestea din urmă — celulele somatice — ADN nu variază cantitativ în funcţie de gradul lor de diferenţiere funcţională sau de starea lor metabolică; *c)* caracterul său metabolic stabil, datorită căruia el nu este degradat atîta timp cît celula este integră, ci este transmis intact în celulele-fiice; *d)* coincidenţa dintre acţiunea mutagenă maximă a radiaţiilor UV cu lungimea de undă de 2 537 Å şi zona de absorbţie a radiaţiei ultraviolete corespunzătoare ADN.

Utilizarea microorganismelor ca model experimental a făcut posibilă obţinerea a trei probe hotărîtoare relativ la rolul genetic al acizilor nucleici:

— Avery, McLeod şi McCarthy (1944) au demonstrat că principiul activ al *transformării genetice* a pneumococului în experienţele din 1928 ale lui Griffith este reprezentat de un fragment de moleculă de ADN pur, cu grad înalt de polimerizare. Anularea efectului transformant în prezenţa dezoxiribonucleazei constituie o dovadă suplimentară a funcţiei genetice a ADN.

— Hershey şi Chase (1952), experimentînd cu fagul T_2, au marcat pe rînd capsida proteică a fagului cu S^{35} şi ADN fagic cu P^{32}. După adsorbţia pe bacterii sensibile a particulelor fagice astfel marcate, agitarea violentă a suspensiei bacteriene îndepărta de la suprafaţa celulelor capsidele fagice mar-

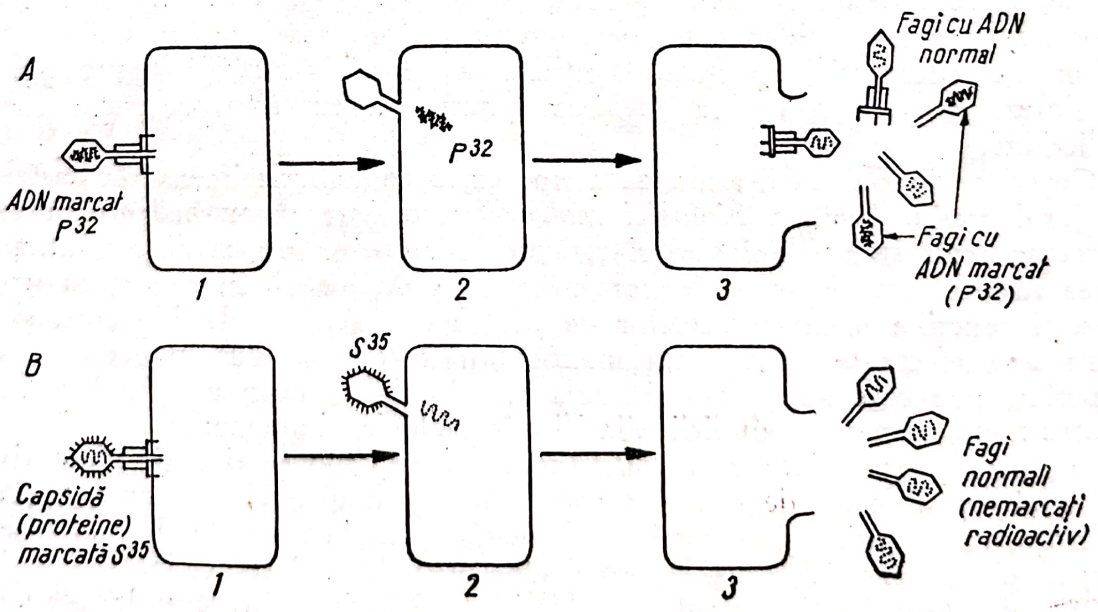


Fig. 264. Reprezentare schematică a experienţei lui Hershey şi Chase care demonstrează că ADN este unicul purtător al informaţiei genetice fazice.

cate cu S^{35}, în timp ce ADN fagic marcat cu P^{32} putea fi pus în evidenţă (datorită atomului radioactiv) în interiorul celulelor bacteriene. Dar, deşi era evident că bacteriile fuseseră infectate exclusiv cu ADN viral, liza lor ulterioară libera particule fagice mature. La unele dintre aceste particule, genomul mai era marcat cu P^{32}, însă nici una nu conţinea S^{35} în capsida sa proteică. Aceasta dovedeşte că sinteza noii proteine de înveliş a fagului, ca şi multiplicarea particulelor fagice în celula infectată au fost induse exclusiv de ADN viral.

— Gierer şi Schramm (1956) şi Fraenkel-Conrat (1957), lucrînd cu virusul mozaicului tutunului (VMT), au demonstrat că la acest virus lipsit de ADN rolul de purtător al informaţiei genetice este jucat de ARN, care este infectant şi în stare pură, pe cînd proteina virală izolată este neinfectantă, deci genetic inertă. Într-adevăr, introdus la o plantă receptivă sănătoasă, ARN pur inducea formarea de virioni compleţi, constituiţi din ARN învelit într-o capsidă proteică. Dacă, pe de altă parte, cele două fracţiuni ale virusului — ARN şi proteina — erau puse în contact *in vitro*, ele se reuneau automat, printr-un proces de *autoasamblare* asemănător celui de cristalizare, pentru a forma virus complet, matur, cu morfologia sa caracteristică şi foarte infecţios. Capacitatea de autoasamblare se datoreşte uniformităţii structurale a celor 2 130 de molecule de proteină, care au toate aceeaşi mărime specifică, aceeaşi formă şi aceeaşi secvenţă specifică a aminoacizilor.

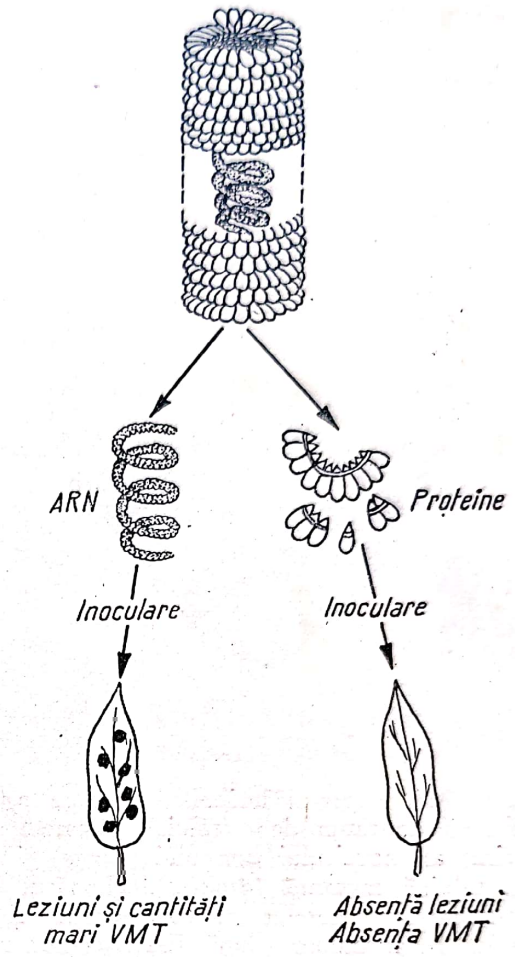


Fig. 265. Reprezentare schematică a experienţelor lui Fraenkel-Conrat cu VMT, demonstrînd infecţiozitatea şi rolul genetic al ARN viral.

Pornind de la descoperirea proprietăţii de autoasamblare, Fraenkel-Conrat a efectuat o nouă experienţă care a adus o probă suplimentară convingătoare asupra rolului genetic al acidului nucleic. Într-o primă etapă a experienţei, el a degradat la constituenţii lor esenţiali — ARN şi proteină — corpusculii elementari a două tulpini de VMT: tulpina sălbatică normală *A* şi tulpina mutantă *B*, obţinută sub acţiunea mutagenă a acidului nitros, care se deosebea de cea dintîi prin natura leziunilor produse la plante şi prin structura modificată a proteinei virale de înveliş, rezultînd din modificarea prin mutaţie a genomului constituit din ARN. Într-o a doua etapă experimentală, s-a realizat reconstituirea unui virus — de astă dată „hibrid" — prin punerea în contact *in vitro* a ARN provenit de la virusul sălbatic de tip *A*

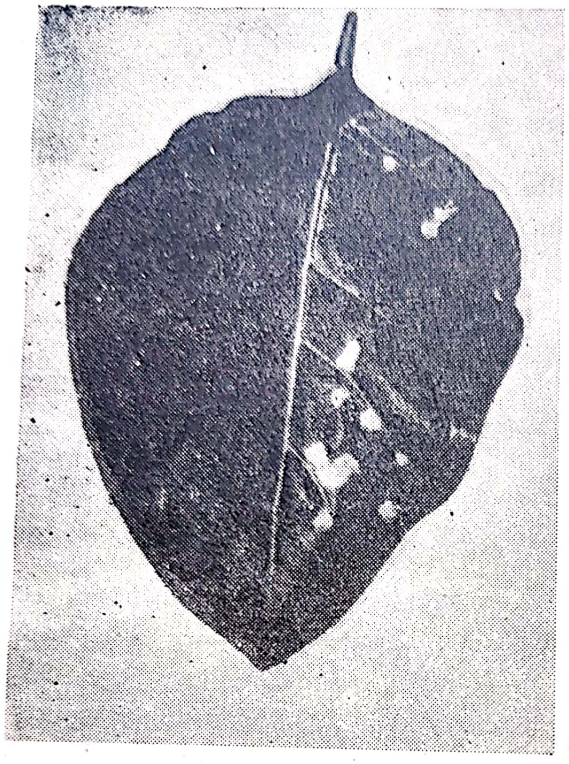


Fig. 266. Aspectul leziunilor produse pe o frunză de tutun de o tulpină sălbatecă de virus al mozaicului tutunului (*stînga*) şi de o tulpină mutantă (*dreapta*). Numărul leziunilor este corelat cu concentraţia virusului în inoculum (după Fraenkel-Conrat).

cu proteina separată de la tulpina mutantă *B*. Inoculat la o plantă sănătoasă, virusul „hibrid" astfel obţinut producea simptomele specifice bolii determinate de virusul sălbatic *A*, iar din planta bolnavă se izolau numai particule virale identice prin toate caracterele (inclusiv structura capsidei proteice) virionilor de tipul *A*. Virusul „hibrid" creat *in vitro* îşi pierduse, prin urmare, identitatea în planta-gazdă, deoarece ARN de tip *A* din structura lui s-a replicat ca atare, dar a determinat şi biosinteza unei proteine de tip omolog pentru constituirea capsidei noilor particule virale (fig. 267).

2. STRUCTURA FIZICO-CHIMICĂ A ADN

ADN este o substanţă *macromoleculară* cu molecula extrem de lungă, foarte subţire şi destul de rigidă, corespunzînd unui polinucleotid, polimer format dintr-un număr mare de nucleotide. La rîndul lor, nucleotidele sînt constituite din trei tipuri de molecule: o bază azotată, de natură fie purinică — *adenina (A)* ori *guanina (G)* fie pirimidinică — *timina (T)* ori *citozina (C)* — o pentoză care este totdeauna *dezoxiriboza* şi un *radical fosforic*.

Modelul de structură fizico-chimică imaginat de Watson şi Crick (1953) şi confirmat ulterior prin probe experimentale sugerează că ADN este o moleculă ideală pentru depozitarea informaţiei genetice, ceea ce permite înţelegerea mecanismelor de conservare şi transmitere a caracterelor specifice ereditare.

Conform reprezentării propuse prin acest model, particularitatea cea mai importantă a moleculei de ADN este configuraţia sa spaţială, care, de obicei, implică două catene polimerice subţiri, foarte lungi, răsucite una în jurul celeilalte în formă de dublă helice regulată. Fiecare lanţ al dublei molecule este un polinucleotid în care monomerii nucleotidici — alcătuiţi din bază, pentoză şi fosfat — sînt cuplaţi prin legături puternice fosfat-dezoxiriboză, pentoza unui nucleotid fiind legată printr-o grupare fosfat de zahărul nucleotidului adiacent. Pe de altă parte, tot de molecula de pentoză este legată în fiecare monomer şi baza sa, fie purinică, fie pirimidinică.

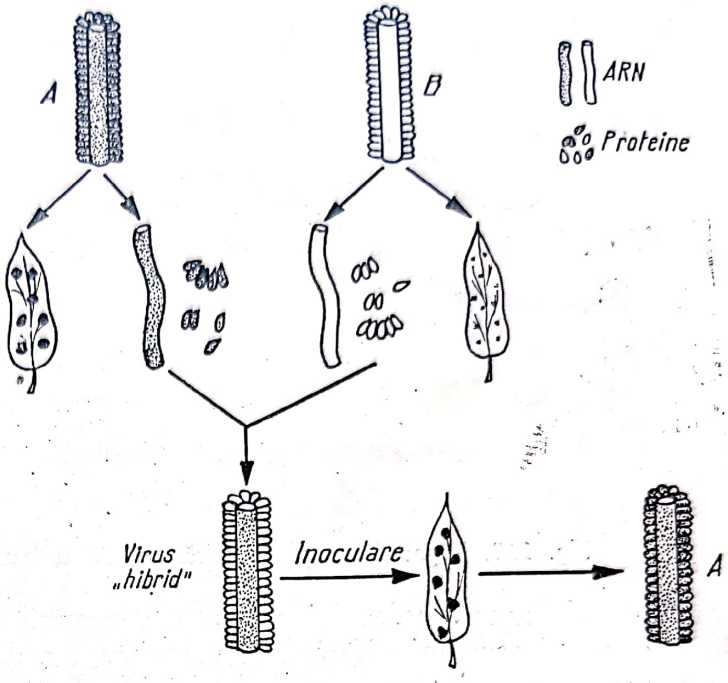


Fig. 267. Reprezentare schematică a unor experienţe care confirmă rolul genetic al acizilor nucleici. Virusul „hibrid" al mozaicului tutunului rezultat din asamblarea ARN de tip sălbatic (*A*) cu proteina virală a unei mutante (*B*) determină leziuni foliare şi biosinteză virală corespunzătoare tipului sălbatic de la care provine ARN.

Cele două lanţuri polinucleotidice astfel constituite sînt menţinute împreună prin punţi slabe de hidrogen, care se stabilesc între grupările aminate şi cele hidroxilice ale bazelor dispuse faţă în faţă pe cele două catene. Această împerechere a bazelor prin punţi de H este riguros specifică şi se limitează la combinaţiile *A-T* (sau *T-A*) şi *G-C* (sau *C-G*), singurele posibile ţinînd seama de mărimea moleculelor legate şi de poziţia atomilor lor de hidrogen. Într-ade-

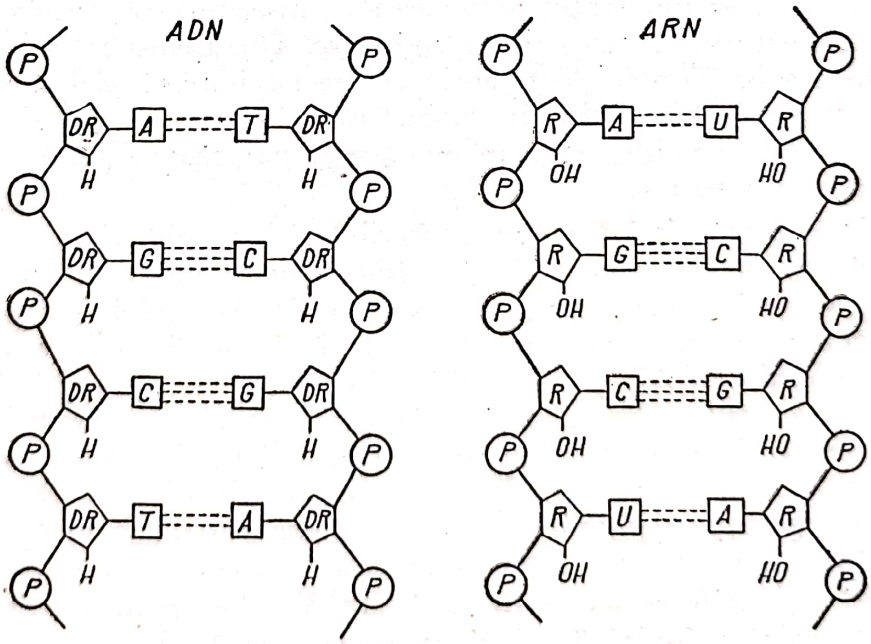


Fig. 268. Structura chimică a moleculelor de ADN şi ARN dublu catenar. Pentru simplificare, cele două catene ale helicei sînt prezentate ca fiind paralele (*DR* = dezoxiriboză; *R* = riboză).

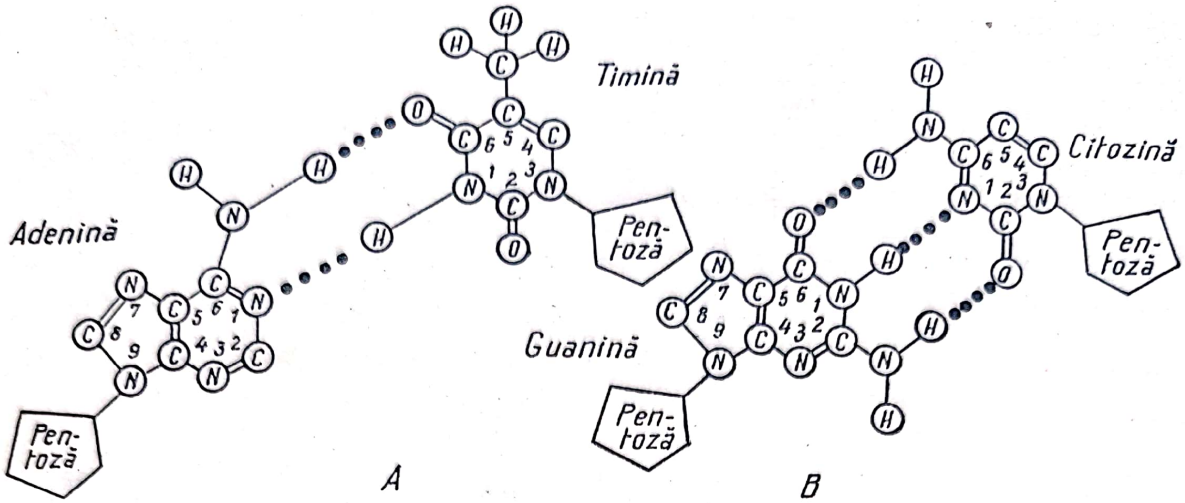


Fig. 269. Legarea complementară (*A*, *B*) a bazelor în structura ADN.

văr, catenele macromoleculei trebuie să rămînă paralele, iar cele două tipuri de baze au dimensiuni diferite. Împerecherea a două purine (de exemplu *A-G*) ar ocupa prea mult spaţiu, ceea ce ar produce distorsia helicei, iar legarea a două pirimidine (*T-C*) ar ocupa, dimpotrivă, un spaţiu prea mic. Astfel, numai legarea specifică realizată prin constituirea de punţi de H de tipul *A-T* şi *G-C* se poate încadra în structura spaţială obligatorie a macromoleculei de ADN.

Ca urmare a modului riguros prescris de legare intercatenară, secvenţa bazelor dintr-unul din lanţuri *specifică*, adică determină cu o necesitate absolută, secvenţa bazelor din lanţul opus, ceea ce înseamnă că cele două lanţuri au în mod obligatoriu *secvenţe complementare*. Un asemenea tip determinat de împerechere a bazelor de pe catenele vecine nu implică nici o restricţie în ceea ce priveşte succesiunea lor în lungul uneia dintre catene, dar secvenţa bazelor într-un lanţ condiţionează în mod strict pe aceea a bazelor care alcătuiesc lanţul complementar.

O consecinţă stereochimică a împerecherii bazelor după tipul *A-T* şi *C-G* este aceea că cele două catene polinucleotidice sînt orientate în direcţii *opuse*. Ele se răsucesc una în jurul celeilalte, ceea ce dă moleculei duble un aspect helicoidal, după cum o demonstrează spectrul ei de difracţie a razelor *X*. Schematic, molecula de ADN ar putea fi asemănată cu o scară în spirală — orientată după o helice dextrorsă — ale cărei laturi ar fi reprezentate de succesiunea regulată pentoză-fosfat din lungul fiecărei catene şi ale cărei trepte, dispuse perpendicular faţă de axul lung al spiralei, ar consta din perechile de baze legate prin punţile de H care unesc cele două catene.

În ansamblu, molecula de ADN are o formă regulată şi constantă: diametrul helicei este uniform — aproximativ 20 Å — pe toată lungimea ei, iar fiecare tur de spiră măsoară 34 Å şi corespunde la 10 baze nucleotidice. În funcţie de provenienţa lor, moleculele de ADN se deosebesc însă prin lungimea polinucleotidului, prin frecvenţa cu care se întîlneşte un nucleotid dat şi, mai

ales, prin succesiunea specifică a bazelor, graţie cărora informaţia genetică este înscrisă în moleculă sub forma unui *mesaj codificat* cu ajutorul unui alfabet de patru litere, corespunzătoare celor patru baze — *A*, *T*, *G* şi *C*.

Structura fizico-chimică a moleculei de ADN, aşa cum este sugerată de modelul lui Watson şi Crick, explică atît atributele principale ale materialului genetic, adică *specificitatea* determinată de o anumită secvenţă a bazelor şi *capacitatea de replicare*, ţinînd de posibilitatea de asamblare pe cale enzimatică a unor catene noi, complementare celor care le-au servit de model, cît şi mecanismul de inducţie a mutaţiilor, care constă în esenţă din modificarea secvenţei bazelor prin adiţie, deleţie, substituire sau inversare de baze.

Diversitatea raportului cantitativ al bazelor nucleice în lumea vie

Analiza conţinutului în baze al moleculelor de ADN de diverse origini a arătat că, deşi orice ADN conţine aceleaşi patru baze, cantităţile relative ale acestora variază în funcţie de sursa biologică de la care provine molecula respectivă. Ansamblul datelor acumulate în această privinţă permite două generalizări:

1) Raportul $A+T/G+C$ din constituţia ADN variază în limite mari la bacterii şi la virusuri, la protozoare şi la alte nevertebrate. Diferenţele între anumite grupe de organisme sub raportul valorii acestui raport oglindesc, probabil, natura legăturii lor filogenetice, întrucît ele nu sînt întîmplătoare ci, după cum s-a observat, sînt cu atît mai mici cu cît înrudirea taxonomică este mai strînsă (tab. 20). Raportul este însă foarte constant şi caracteristic pentru o specie dată. Astfel, la bacterii, se cunosc specii de *tip AT*, cum este *Clostridium welchii* (*GC* 27%) şi specii de *tip GC*, ca *Micrococcus lysodeikticus* (*GC* 72%). Spre deosebire de microorganisme, vertebratele au toate aproximativ aceeaşi compoziţie a bazelor ADN (*GC* 40%), corespunzătoare unui exces de *AT*.

2) În ciuda diferenţelor mari în ceea ce priveşte cantităţile relative ale bazelor în ADN de diferite provenienţe, raportul total purine-pirimidine, ca şi raporturile *A/T* şi *G/C* sînt totdeauna egale cu 1. Descoperirea acestui raport de paritate în proporţia de *A* şi *T*, ca şi de *G* şi *C*, a avut o deosebită importanţă pentru orientarea cercetărilor care au dus la descifrarea în detaliu a structurii ADN.

Variaţiile de compoziţie cantitativă în baze şi omologiile în ceea ce priveşte secvenţa bazelor la moleculele de ADN de origine diferită sînt folosite drept *criteriu taxonomic* pentru clasificarea bacteriilor şi a protozoarelor. În general, organismele care, pe baza criteriilor fiziologice, apar ca înrudite din punct de vedere taxonomic au şi o compoziţie în baze a ADN foarte asemănătoare. Variaţia mult mai restrînsă a compoziţiei în baze a ADN la animalele din grupul vertebratelor nu permite utilizarea ei drept criteriu de stabilire a unor relaţii filogenetice în cadrul acestui grup.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 20

VARIAŢIILE RAPORTULUI BAZELOR $\frac{A+T}{G+C}$ DIN MOLECULELE DE ADN ÎN FUNCŢIE DE POZIŢIA SISTEMATICĂ A ORGANISMELOR

Sursa de ADN	$\frac{A+T}{G+C}$	Sursa de ADN	$\frac{A+T}{G+C}$
Bacteriofag T_2	1,84	*Saccharomyces cerevisiae*	1,80
Bacteriofag λ	1,06	*Aspergillus niger*	1,00
Azotobacter agile	0,82	*Scenedesmus quadricauda* (algă)	0,57
Bacillus megaterium	1,66	*Rhabdonema adriaticum* (algă)	1,71
Escherichia coli	0,97	Grîu	1,22
Clostridium welchii	2,7	*Paracentrotus lividus* (ariciul de mare)	1,86
Micrococcus lysodeikticus	0,39	*Locusta migratoria*	1,41
Mycobacterium tuberculosis	0,60	Găină	1,36
Pseudomonas aeruginosa	0,51	Cal	1,33
Proteus vulgaris	1,74	Om	1,40

3. REPLICAREA ADN

Materialul genetic se replică, adică se reproduce întocmai, astfel încît în urma diviziunii celulare informaţia genetică purtată de el este transmisă ca atare celulelor-fiice. Complementaritatea bazelor determină o structură ideal adaptată pentru replicare pentru că, după separarea celor două catene ale moleculei de ADN, fiecare dintre ele poate acţiona ca „template" (model sau matriţă) pentru sinteza unei noi catene complementare. Replicarea ADN este deci un proces biochimic foarte specific, prin care secvenţa bazelor din catena de ADN servind drept matriţă, dictează secvenţa bazelor catenei noi în curs de constituire.

Formarea unor copii care sînt identice cu materialul servind ca matriţă sau model se bazează pe o caracteristică generală a proceselor de tip „template" în ereditate, şi anume aceea că nu există nici o restricţie chimică obligatorie pentru ordinea în care diferiţii monomeri — blocuri de construcţie — pot fi polimerizaţi în structuri macromoleculare, singurul criteriu preexistent cu caracter obligatoriu fiind conformitatea cu particularităţile de structură ale modelului sau matriţei corespunzătoare.

Mecanismul de copiere exactă reprezentat de replicarea ADN asigură nu numai conservarea caracterelor normale, specifice, dar şi conservarea oricărui „accident" survenit în cursul replicării. Mecanismele replicării nu sînt absolut

infailibile şi o „greşeală" o dată apărută — cum se întîmplă accidental în cazul mutaţiilor — este păstrată, reprodusă şi multiplicată, dacă prin apariţia sa nu afectează însăşi viaţa celulei în care a apărut (aşa cum o fac mutaţiile letale).

Modelul lui Watson şi Crick privitor la structura fizico-chimică a ADN face posibilă explicarea modului în care se produce replicarea corectă, ca şi a modului în care survin şi se transmit erorile de replicare. Conform acestui model, replicarea ar fi iniţiată printr-o despicare longitudinală progresivă a moleculei dublu helicale, care s-ar desface (ca un fermoar) prin ruperea succesivă a punţilor de H dintre bazele complementare. Desfacerea longitudinală incompletă a dublei catene ar da moleculei în curs de replicare forma literei *Y*, ceea ce reprezintă aşa-numitul mecanism de replicare în *Y*. Corpul vertical al literei ar reprezenta porţiunea de ADN parental, care rămîne temporar bicatenară, iar cele două „braţe" ale ei ar corespunde catenelor laterale

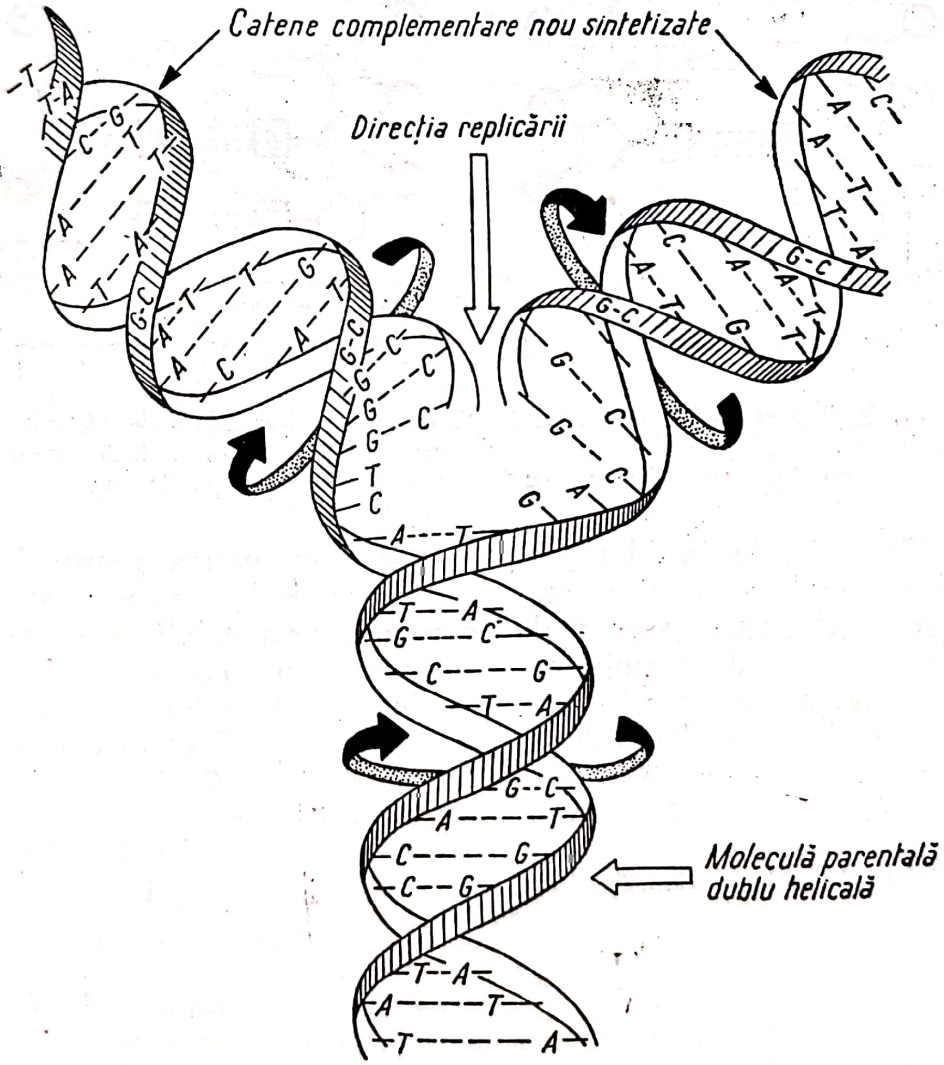


Fig. 270. Mecanismul replicării în „Y" a moleculei de ADN. Săgeţile negre curbate indică direcţiile de rotaţie ale catenelor. Cele două catene noi cresc în direcţiile descendentă (după Stent).

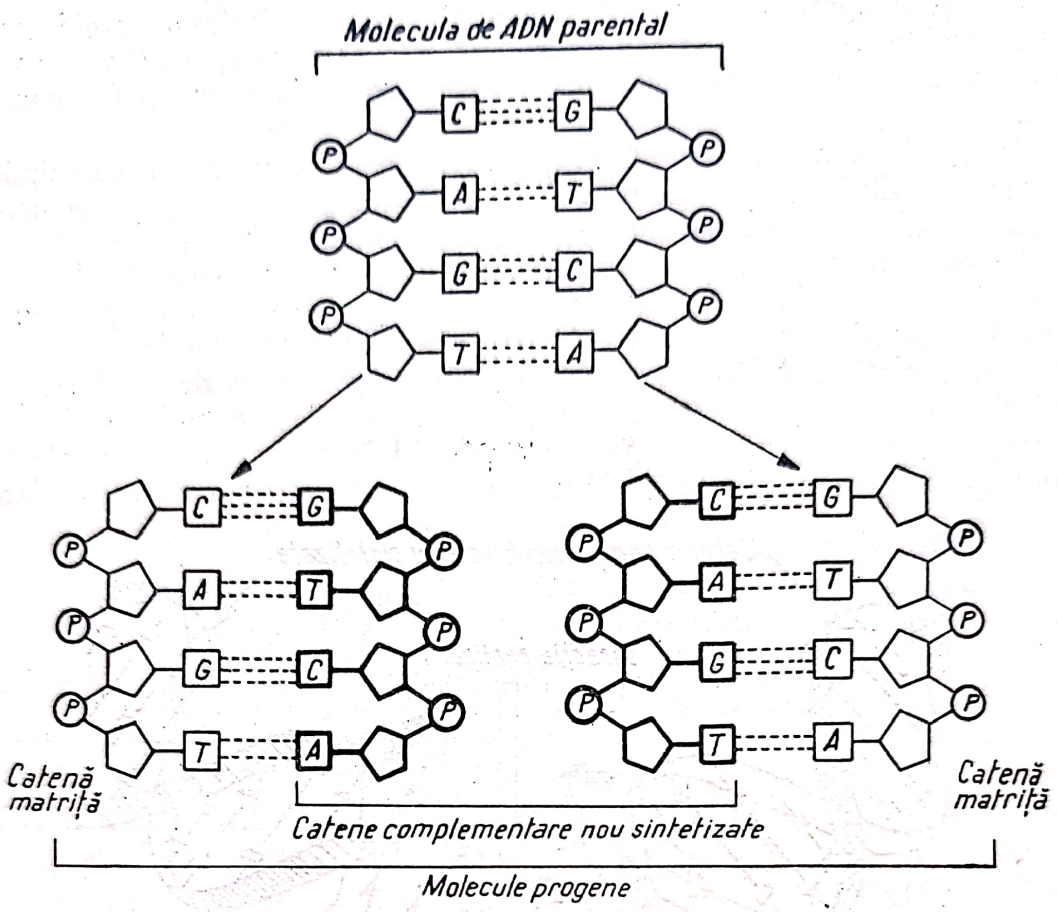


Fig. 271. Replicarea moleculei ADN. După desfacerea legăturilor de H, cele două catene ale moleculei parentale servesc ca model pentru sinteza a două catene noi, complementare (desenate cu linie mai groasă — după Braun).

devenite libere şi care, în felul acesta, pot servi ca matriţe pentru dispunerea ordonată a unor baze complementare sub formă de lanţuri noi, gata de a se ataşa la cele vechi, adică la propriile lor matriţe, prin stabilirea punţilor de H. Pe măsură ce procesul de replicare progresează, porţiunea bicatenară a moleculei se scurtează iar catenele-matriţe se lungesc. În felul acesta, desfacerea dublei catene şi sinteza lanţurilor complementare noi evoluează concomitent.

Modelul de structură a ADN al lui Watson şi Crick sugerează că, datorită complementarităţii lor, cele două lanţuri polipeptidice ale unei duble molecule au o polaritate opusă. Aceasta lasă să se presupună că în procesul de replicare cele două lanţuri noi sînt sintetizate în direcţii opuse.

Replicarea ADN se realizează cu ajutorul unei enzime nespecifice din punctul de vedere al originii ADN, ADN-*polimeraza* sau *dezoxiribonucleotid-polimeraza*, capabilă să catalizeze polimerizarea nucleotidelor în funcţie de secvenţa bazelor din molecula care acţionează ca „template". Cu ajutorul acestei enzime, izolată de Kornberg din extracte acelulare de *E. coli*, procesul de replicare a ADN a putut fi studiat *in vitro*. Sub acţiunea ADN-polimerazei este „copiat" orice ADN adăugat ca model într-un sistem acelular

in vitro, ceea ce duce la formarea unui produs dublu catenar cu greutate moleculară mare, avînd aceeaşi compoziţie în baze şi o aceeaşi succesiune a acestora ca şi molecula-matriţă. Dar, în timp ce sinteza *in vivo* se face în mod coordonat, în sensul că este riguros reglată şi sincronizată cu diviziunea celulară, şi cu viteza foarte mare de circa 0,8μ/s, corespunzînd asamblării a aproximativ 2 000 de nucleotide, biosinteza în sisteme acelulare — *in vitro* — decurge anarhic şi într-un ritm mult mai lent. Procesul necesită prezenţa celor patru dezoxiribonucleotid-5-trifosfaţi ca material de construcţie, a enzimei specifice, a unui ADN cu rol de matriţă şi a ionilor Mg^{++}. Reacţia evoluează după schema:

$$\begin{array}{l} n \text{ dezoxiadenozintrifosfat} \\ n \text{ dezoxiguanozintrifosfat} \\ n \text{ dezoxicitidintrifosfat} \\ n \text{ dezoxitimidintrifosfat} \end{array} \left[\begin{array}{l} (dAPPP) \\ (dGPPP) \\ (dCPPP) \\ (dTPPP) \end{array}\right] \xrightarrow[\text{ADN („template")} \; + Mg^{++}]{\text{ADN-}polimeraza \; +}$$

$$\text{ADN} \quad + \left[\begin{array}{l} dAP \\ dGP \\ dCP \\ dTP \end{array}\right]_n \quad \begin{array}{l} +4\,(n)\,PP \\ \textit{pirofosfat anorganic} \end{array}$$

ADN rezultat din reacţie este un polimer dublu helical cu o greutate moleculară de circa 5 000 000 şi cu o secvenţă a bazelor complementară aceleia a ADN care a servit ca model.

a. Mecanismul replicării ADN

Pentru explicarea modului de transmitere a informaţiei genetice în cursul replicării ADN, s-au sugerat trei mecanisme posibile prin care molecula-fiică de ADN ar deriva din molecula parentală, şi anume:

1) *Replicarea de tip conservativ*, care s-ar putea realiza în două variante:

a) cele două catene ale moleculei parentale ar rămîne unite în cursul replicării şi ar transmite informaţia genetică, într-un mod necunoscut, unei molecule noi, care ar fi sintetizată *in toto*;

b) cele două catene parentale s-ar separa temporar şi ar acţiona fiecare ca matriţă, după care atît catenele vechi cît şi cele noi s-ar reuni în molecule dublu helicale.

2) *Replicarea de tip semiconservativ* — sugerată de modelul moleculei ADN al lui Watson şi Crick — care implică un caracter „hibrid" al moleculei-fiice de ADN: fiecare moleculă nouă de ADN ar fi formată dintr-o catenă parentală din generaţia anterioară şi o catenă nou-sintetizată, complementară faţă de cea dintîi.

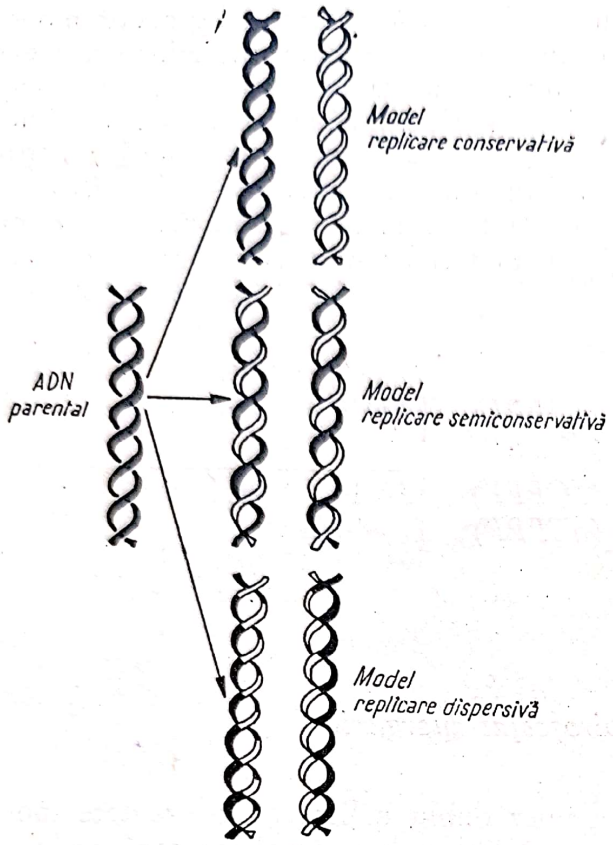


Fig. 272. Reprezentare schematică a modelelor ipotetice de replicare a moleculei de ADN. Zonele negre corespund catenelor (sau porţiunilor de catenă) provenite din molecula parentală, iar cele albe, porţiunilor de moleculă nou sintetizate.

3) *Replicarea de tip dispersiv*, care s-ar produce prin fragmentarea transversală a dublei helice de ADN, urmată de reutilizarea fragmentelor rezultate pentru formarea moleculelor progene; moleculele-fiice de ADN ar conţine deci atît resturi din vechea moleculă cît şi porţiuni nou-sintetizate.

Caracterul *semiconservativ* al replicării ADN a fost demonstrat experimental de Meselson şi Stahl (1958) la bacterii, cu ajutorul tehnicilor de separare a moleculelor de ADN, în funcţie de densitatea lor, prin centrifugare în gradient de clorură de cesiu (CsCl).

Principiul metodei. Dacă o soluţie concentrată de săruri de metale grele (în cazul dat, CsCl 7M cu densitate aproximativ 1,70) este centrifugată la viteze foarte mari timp îndelungat (20 de ore la 44 000 ture/minut), moleculele individuale se distribuie în cîmpul centrifugal după un gradient de densitate foarte uniform: densitatea soluţiei este foarte mare la fundul tubului şi scade treptat spre suprafaţa lichidului. Cînd într-o astfel de soluţie salină se adaugă o substanţă cu densitate necunoscută, moleculele acestei substanţe se depun prin ultracentifugare într-o anumită bandă a gradientului de CsCl, respectiv în zona în care densitatea moleculelor de sare corespunde densităţii de plutire a substanţei date. În cazul ADN, care are capacitatea de a absorbi razele UV cu lungimea de undă de 2 500 Å, această proprietate poate servi pentru a-l localiza cu precizie în zona de gradient în care este depus.

Meselson şi Stahl au cultivat *E. coli* pe medii cu azot radioactiv (N^{15}) ca unică sursă de azot, astfel încît ADN extras din aceste celule marcate nu conţinea decît azot greu. Ca urmare, ADN marcat se depunea într-o zonă de densitate a gradientului de CsCl mai mare decît aceea corespunzătoare densităţii ADN normal conţinînd azot stabil. Bacterii cu ADN marcat au fost apoi transferate într-un mediu care conţinea numai azot stabil (N^{14}), mediu în care au fost menţinute doar un timp scurt, corespunzînd unei singure diviziuni celulare. Analiza ADN a acestei noi generaţii de bacterii a arătat că el se depunea în întregime într-o zonă de densitate intermediară faţă de cele caracteristice pentru N^{15} şi N^{14}, ceea ce se explică prin faptul că moleculele de ADN nou-formate erau alcătuite dintr-un lanţ vechi (cu N^{15}), care a servit ca matriţă, şi unul nou (cu N^{14}) complementar faţă de primul. Dacă durata culti-

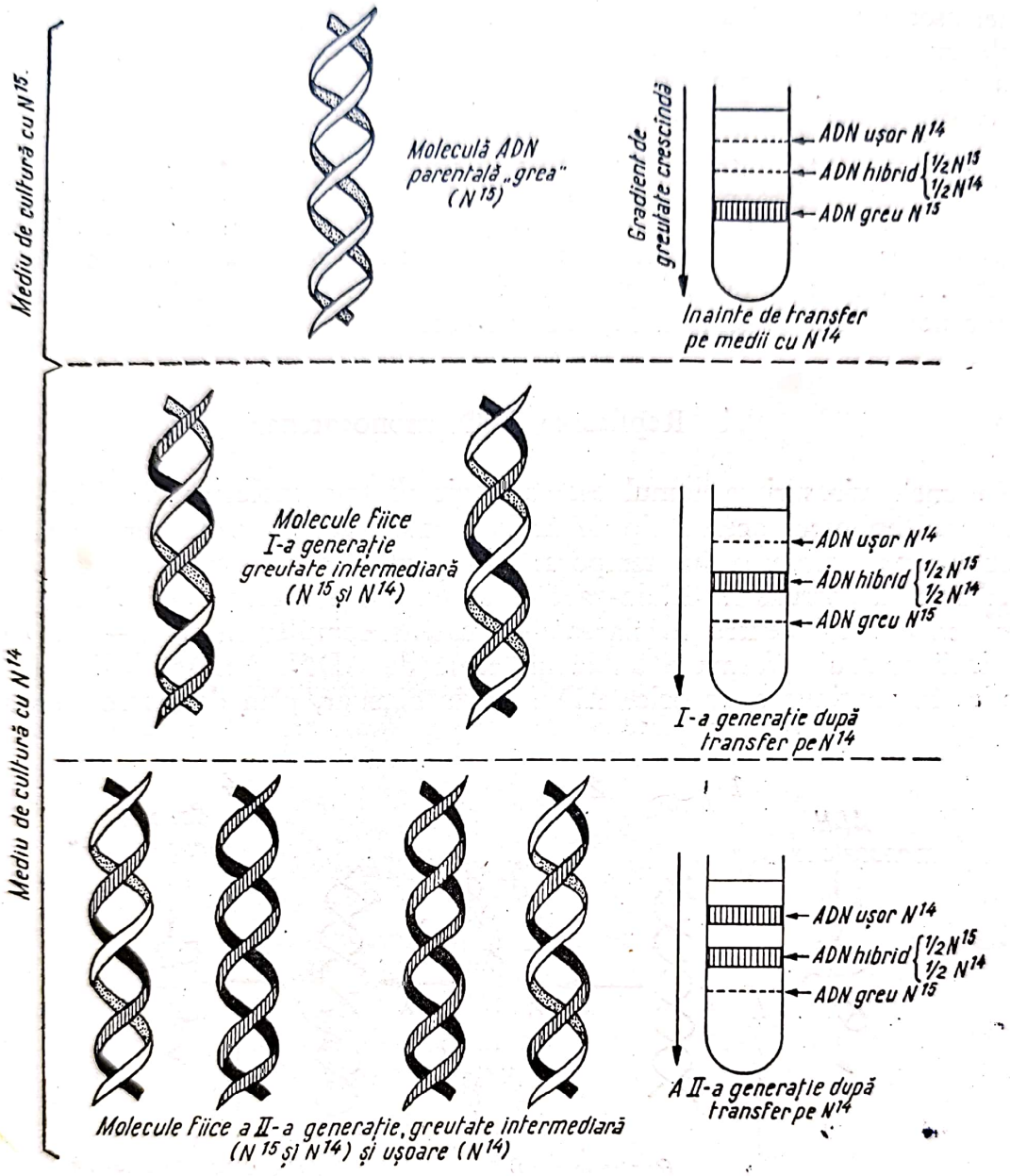


Fig. 273. Reprezentare schematică a experienţelor lui Messelson şi Stahl care demonstrează caracterul semiconservativ al replicării ADN. În dreapta este indicat nivelul la care sedimentează diferitele tipuri de molecule de ADN în funcţie de densitatea lor, atunci cînd sînt supuse centrifugării în gradient de CsCl.

vării pe mediul cu azot stabil era mai mare, suficientă, de exemplu, pentru dezvoltarea a două generaţii — deci pentru două diviziuni celulare — ADN se depunea în două benzi de sedimentare: una de densitate intermediară, caracteristică moleculelor hibride, şi una de densitate mai mică, tipică pentru moleculele uşoare care conţin numai N^{14}. Această distribuţie se explică prin faptul că, în cursul replicării fiecărei molecule hibride după matriţa catenei grele (cu N^{15}) s-au format noi molecule hibride, în timp ce după aceea a ca-

tenei uşoare (cu N^{14}) s-au sintetizat molecule uşoare, care aveau în constituţia ambelor catene azot stabil. În generaţiile următoare, se constată extinderea benzii de sedimentare a moleculelor uşoare (cu N^{14}) în dauna benzii intermediare corespunzătoare moleculelor hibride (cu N^{14} şi N^{15}).

Experienţa lui Meselson şi Stahl demonstrează foarte limpede caracterul „semiconservativ" al replicării moleculei dublu catenare de ADN, determinat de faptul că fiecare catenă este capabilă să acţioneze ca matriţă şi să dirijeze selecţia bazelor pentru constituirea cîte unui lanţ nou, complementar. Astfel, fiecare moleculă ADN conţine o catenă veche — matriţa — şi una nouă, complementară faţă de cea veche.

b. Replicarea ADN monocatenar

La unele virusuri, genomul este alcătuit dintr-o moleculă de ADN monocatenar. Replicarea acestui tip de ADN viral în celula-gazdă parazitată începe probabil prin trecerea lui temporară în forma de moleculă dublu catenară: imediat ce a pătruns în celula-gazdă, catena unică a genomului viral (+) serveşte ca matriţă pentru formarea unei catene complementare (—) cu care se asociază pentru a forma o dublă moleculă de ADN. Această helice dublă se replică în continuare, ca orice ADN dublu catenar, prin desfacerea legăturilor

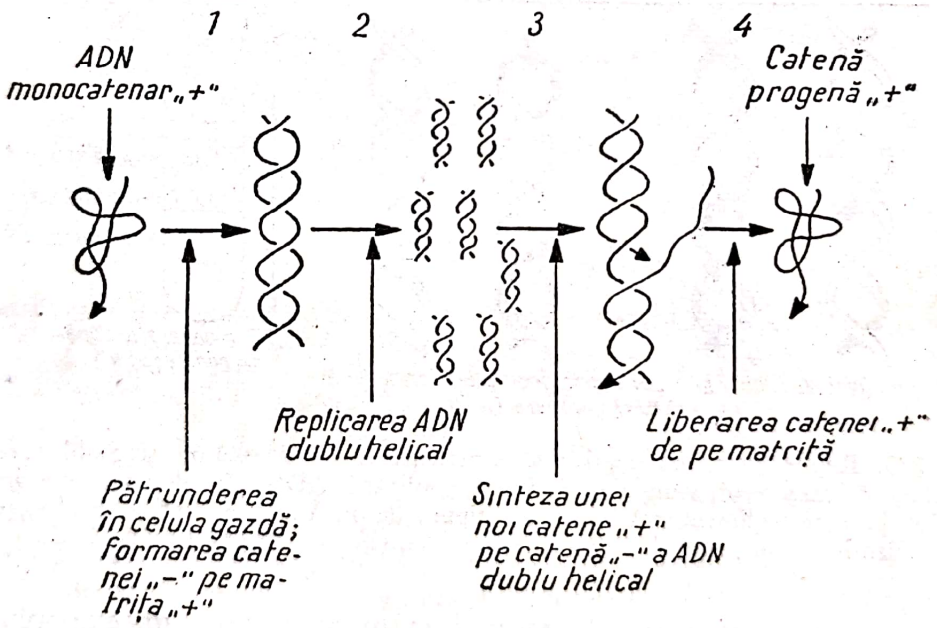


Fig. 274. Replicarea unei molecule ADN monocatenar. Genomul viral monocatenar „+" pătrunde în celula-gazdă (*1*) unde trece temporar în formă de molecule dublu helicală cu catene „+" şi „—" (*2*) capabile de replicare (*3*). Ulterior, catenele „—" ale acestor molecule servesc ca matriţă pentru sinteza de noi catene „+" care se liberează de pe catenele matriţă (*4*) şi sînt utilizate pentru formarea de particule virale progene (după Watson).

intercatenare de H şi legarea bazelor într-o anumită secvenţă pentru formarea unei noi catene.

Singura diferenţă faţă de modul obişnuit de constituire a lanţurilor noi de ADN constă în aceea că de astă dată numai catenele „—" din moleculele bicatenare servesc ca model pentru sinteza de ADN viral, reprezentat prin catenele „+". O dată formate pe matriţele constînd din catene „—", lanţurile „+" se eliberează din moleculele duble pentru a constitui, împreună cu învelişul lor proteic nou sintetizat, particulele progene de virus.

4. FUNCŢIILE MATERIALULUI GENETIC

Materialul genetic — ADN sau, la unele virusuri, ARN — poartă înscris în structura sa, sub forma unui cod chimic, totalitatea informaţiei genetice necesare pentru dirijarea întregii activităţi biologice specifice a organismului respectiv sau, în cazul virusurilor, a unora dintre procesele metabolice ale celulelor-gazdă parazitate. Această particularitate, specifică materialului genetic, se traduce prin funcţia sa de „template" sau „matriţă", graţie căreia natura produsului rezultat dintr-o activitate celulară dirijată de el este integral determinată de natura modelului ei depozitar de informaţie genetică.

Comportarea ca „matriţă" a materialului genetic purtător de informaţie are implicaţii de ordin funcţional în viaţa celulei, care pot fi schematizate astfel:

1) *Replicarea*, funcţie esenţială a materialului genetic, este un proces biochimic foarte specific prin care secvenţa bazelor din fiecare dintre catenele moleculei de ADN — sau de ARN cu funcţie genetică — eliberate după desfacerea legăturilor intercatenare de H diotează secvenţa bazelor din catenele complementare în curs de constituire. Datorită acestei specificităţi, în celulele-fiice se transmit, în urma diviziunii celulare, copii identice ale genomului celulei-mamă. Replicarea de acest tip are ca rezultat formarea unui nou genom constituit din ADN, atunci cînd modelul sau matriţa este ADN, sau din ARN, în cazul cînd materialul-matriţă este ARN, aşa cum se întîmplă la unele virusuri şi bacteriofagi.

2) Pornind tot de la ADN ca matriţă, se sintetizează în celulă şi ARN de mesaj, ceea ce corespunde unei alte funcţii specifice a materialului genetic, aceea de *„transcriere"* a informaţiei genetice conţinute în nucleu şi de *transmitere* a ei sub această formă în citoplasmă la ribozomi; la nivelul acestora, informaţia este *„tradusă"* într-un produs nou, care constituie tocmai rezultatul biosintezei proteinelor.

3) *Reglarea* şi *controlul activităţilor celulare*, funcţie de asemenea specifică materialului genetic, se exercită prin intermediul unor „semnale" chimice specifice, graţie cărora se realizează coordonarea dintre replicare şi biosinteza proteinelor. Această acţiune regulatoare se realizează pe două căi: *a*) *activă*, în care materialul genetic acţionează ca „emiţător" de „semnale" chimice, determinînd structura primară — şi deci proprietăţile — unor substanţe proteice cu funcţii regulatoare specifice prin intermediul cărora se stabilesc sau se

Scanned with OKEN Scanner

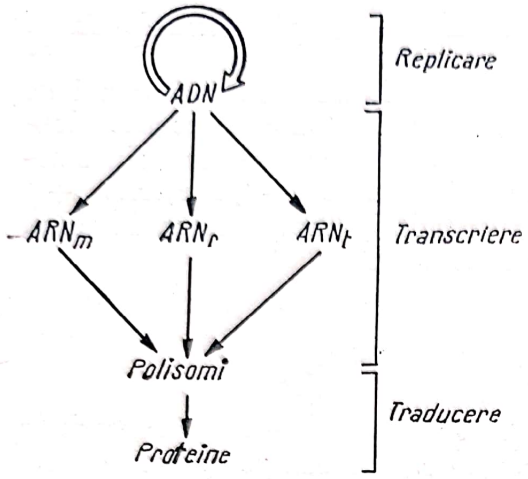


Fig. 275. Reprezentare schematică a rolului ADN în sinteza macromoleculelor celulare specifice.

transmit toate interacţiunile implicate în menţinerea echilibrului intracelular; *b*) *pasivă*, în care materialul genetic se comportă ca „receptor" de semnale chimice, în sensul că diferite secvenţe specifice ale moleculei de ADN (cu funcţie regulatoare), controlează iniţierea şi desfăşurarea unor procese ca replicarea, sub influenţa unor semnale chimice oglindind starea funcţională a celulei în fiecare moment.

4) Materialul genetic al unei celule este susceptibil de modificare fie prin încorporarea unui fragment de material genetic exogen — în procesul de *recombinare genetică* — fie prin *mutaţie*, fenomen spontan sau indus constînd în adăugarea, pierderea, substituirea sau inversarea ordinii unor baze într-una din secvenţele polinucleotidului. O dată modificată, „matriţa" se replică în continuare, astfel încît descendenţii celulei cu un genom schimbat în structura lui posedă o informaţie genetică alterată, a cărei „transcriere" şi „traducere" generează apariţia unor caractere noi, sau pierderea şi modificarea caracterelor originare.

5. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC BACTERIAN

Genomul bacteriilor, ca şi acela al celor mai multe virusuri, este format din ADN pur, necombinat cu proteine de tipul histonelor şi, ca atare, are o structură foarte simplă în comparaţie cu acela al celulelor vegetale şi animale. El este reprezentat în mod obişnuit de o singură moleculă enormă de ADN corespunzînd *cromozomului*, pentru care unii cercetători, bazaţi pe lipsa de analogie dintre această structură şi cromozomii celulelor eucariote, au propus denumirea de „genofor" (purător de material genetic), *lineom* (Kühn, 1961), sau *nucleosom* (Colobert, 1967). Acestui material genetic de bază i se adaugă, la unele celule bacteriene, fragmente suplimentare de material genetic localizate în citoplasmă, cunoscute sub denumirea generică de *episomi* (corpi adăugaţi) şi *plasmide*.

a. Cromozomul bacterian

Examenul electronooptic al secţiunilor ultrafine de celule bacteriene a arătat că ADN, alcătuind materialul nuclear, se prezintă sub forma unui mănunchi de fibre asemenea unei jurubiţe de aţă răsucite cu un diametru de circa 25 Å. În 1961, Kleinschmidt a evidenţiat ADN, izolat de la *Micrococcus lyso-*

deikticus, ca un filament încîlcit, foarte lung, cu un diametru corespunzător structurii duble helicale şi la care se observau extremităţile libere. În aceeaşi perioadă, observaţii făcute cu ocazia studierii procesului de conjugare la *E. coli* sugerau că întreg genomul ar fi într-adevăr dispus într-o structură unică, succesiunea transferării genelor de la celula donatoare la celula receptoare pledînd însă pentru o formă inelară, de buclă închisă, a cromozomului unic (Taylor şi Adelberg). Pentru a pune în evidenţă cromozomul bacterian prin tehnica radioautografiei, Cairns, în 1963, a marcat ADN al *E. coli* prin cultivarea bacteriilor în medii cu timidină tritiată, după care l-a extras cu tehnici blînde capabile să evite riscul de fragmentare a cromozomului, dar facilitînd descîlcirea filamentului care reprezintă molecula. Deşi prin acest procedeu ADN este liberat în cea mai mare parte sub formă de mase încîlcite, aproximativ 1% dintre cromozomi apar intacţi, ca „cercuri" mai mult sau mai puţin încurcate, care întinse au un perimetru de 1 100—1 400 μ. Această lungime este echivalentă cu aceea calculată teoretic, pe baza cantităţii totale de ADN prezent într-un nucleoid sau corp cromatinic, la o bacterie în repaus care nu se multiplică.

Greutatea moleculară a ADN calculată de Cairns este de 2×10^9 daltoni, ceea ce corespunde celei mai mari molecule cunoscute într-un sistem biologic, fiind de circa 1 000 de ori mai mare decît cea mai mare moleculă de proteină. După Watson, cantitatea de ADN din cromozomul *E. coli* este de $2{,}5 \times 10^9 \pm 0{,}5 \times 10^9$, ceea ce ar corespunde capacităţii de a dirija sinteza a 2 000—3 000 de proteine diferite, de dimensiuni medii, iar după Werner Braun greutatea moleculară a ADN ar fi de 6×10^9 daltoni. În concluzie, dacă cromozomul bacterian este alcătuit dintr-o moleculă gigantă de ADN de formă circulară, deci „închisă", moleculă care în condiţii obişnuite este unică, se poate deduce că bacteriile sînt organisme haploide (tab. 21).

Forma circulară a cromozomului bacterian este avantajoasă în două privinţe, şi anume prin aceea că: *1*) protejează molecula de ADN faţă de atacul enzimatic prin dezoxiribonuclează, atac care nu se poate exercita decît asupra unei molecule cu extremităţile libere, deci cu grupări reactive accesibile şi 2) contribuie la reglarea procesului de replicare deoarece, o dată iniţiat într-un „locus" determinat al inelului cromozomic, acest proces se propagă din aproape în aproape de-a lungul dublei catene

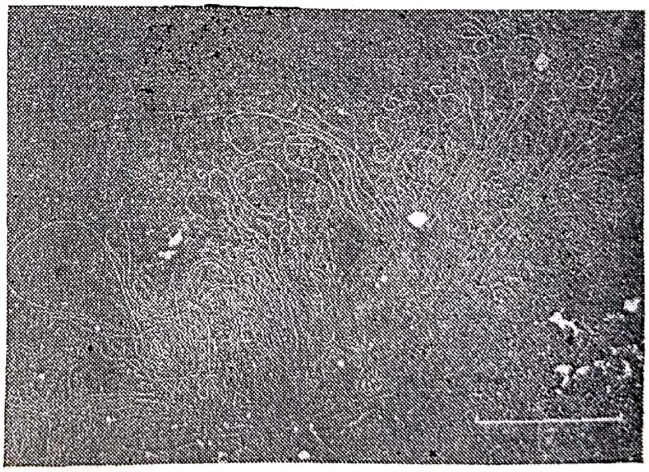


Fig. 276. Microelectronografia unui filament de ADN liberat din bacteria *Micrococcus lysodeikticus* după *dezintegrarea* acesteia la o interfaţă aer-apă (după Kleinschmidt).

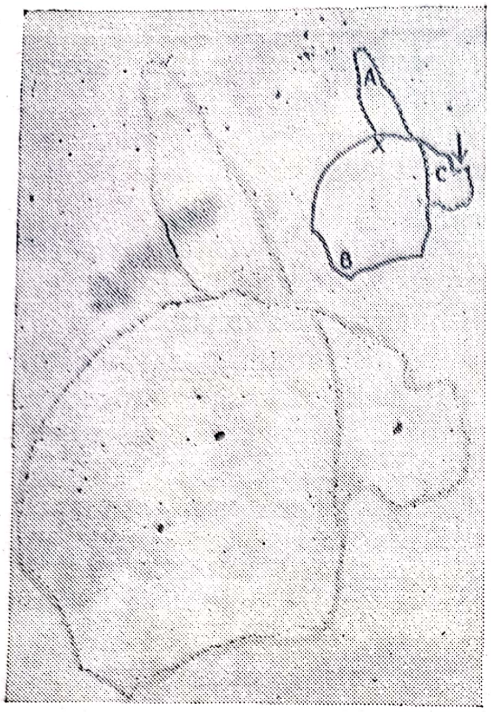


Fig. 277. Radioautografia cromozomului bacteriei *Escherichia coli*, după marcare cu timidină tritiată şi reprezentarea diagramatică a imaginii ei (*dreapta, sus*). Linia punctată — catenă nemarcată; linia continuă — catenă marcată; *A* şi *B* — cele două părţi ale cromozomului deja replicate; *C* — porţiunea încă nereplicată; săgeata indică poziţia punctului de replicare în momentul adăugării timidinei H^3; *y* = punctul de replicare; *x* = poziţia „pivotului" molecular (după Cairns).

TABELUL 21

CANTITATEA DE MATERIAL GENETIC LA DIFERITE ORGANISME VII

	Lungimea [1] moleculei ADN	Greutate [2] moleculară	Nr. haploid de cromozomi	Nr. gene [3]	Nucleotide [4] sau perechi
Fag Φ ×174	1,6 μ	$1,7\times10^6$	1	7	5×10^3
Virus poliom	1,6 μ	$3,0\times10^6$	1	6	$4,7\times10^3$
Fag *T* par	47 μ	$1,3\times10^8$	1	270	2×10^5
Escherichia coli	1,1—1,4 mm	$3,0\times10^9$	1	6×10^3	5×10^6
Aspergillus sp.	1,4 cm	$3,0\times10^{10}$	8	5×10^4	4×10^7
Drosophila	2,7 cm	$5,0\times10^{10}$	4	1×10^5	8×10^7
Porumb	2,4 m	$4,5\times10^{12}$	10	1×10^7	7×10^9
Şoarece	2,1 m	$4,0\times10^{12}$	20	8×10^6	6×10^9
Om	85 cm	$1,6\times10^{12}$	23	3×10^6	$2,5\times10^9$

[1] Lungimea ADN: 3,4 Å/pereche nucleotide.

[2] Greutatea moleculară: 650/pereche nucleotide.
Pentru organismele diploide, cantităţile sînt date pe set de cromozomi.

[3] Calculat socotind 3 nucleotide sau perechi de nucleotide/aminoacid sau 250 aminoacizi pentru o proteină determinată de o genă tipică.

[4] Nucleotide pentru ADN monocatenar, perechi de nucleotide pentru ADN bicatenar.

Scanned with OKEN Scanner

de ADN, pînă cînd ajunge din nou la punctul iniţial, astfel că un nou ciclu de replicare nu poate debuta decît după ce ciclul precedent a fost încheiat, iar cei doi cromozomi circulari rezultaţi din replicare s-au separat complet.

S-a mai demonstrat că, spre deosebire de faza de repaus a creşterii celulare în care bacteria conţine un singur cromozom, în faza sa de creştere exponenţială celula bacteriană are 2—4 cromozomi, care sînt însă identici sub raportul informaţiei genetice, deoarece derivă din replicarea unui acelaşi cromozom parental. Mecanismul acestui fenomen de decalaj între replicare şi diviziunea celulară nu este încă explicat. În schimb, în condiţii de nutriţie care au încetat de a fi optime, replicarea cromozomului se face lent şi astfel fiecare celulă are numai un singur cromozom.

b. Episomii şi plasmidele

În mod obişnuit, întreaga informaţie genetică a celulei bacteriene este înscrisă în cromozomul ei unic de formă circulară. Unele bacterii au însă şi elemente genetice suplimentare, şi anume *episomii* (Jacob şi Monod) şi *plasmidele* (Lederberg; Clark şi Adelberg).

Episomii (etimologic = *corpi adăugaţi*) sînt elemente genetice — cu aceeaşi structură dublu helicală închisă în formă de inel, ca şi aceea a cromozomului dar de dimensiuni mult inferioare — care pot exista în două stări alternative: *autonomă*, ca structuri libere în citoplasmă, capabile de replicare rapidă, independentă de ritmul diviziunii celulare şi, de aceea, prezente în număr mare în celulă; *integrată*, ca structură unică încorporată în cromozom prin deschiderea ambelor formaţii circulare — episomul şi cromozomul — şi reunirea lor prin extremităţi într-o singură dublă elice inelară; în acest caz, episomul nu se mai multiplică decît simultan cu cromozomul în care s-a inserat.

Episomii cei mai bine cunoscuţi sînt fagul temperat şi factorul de sex *F*.

Plasmidele sînt unităţi genetice localizate în citoplasmă, care persistă indefinit în celula bacteriană numai în stare autonomă. În categoria plasmidelor intră factorul „*r*" determinant al rezistenţei la antibiotice, factorul „*col*", răspunzător de colicinogenie, şi factorul *F'*, derivat al factorului *F* integrat care a încorporat un fragment de cromozom. După Watanabe factorul „*r*" ar fi de natură

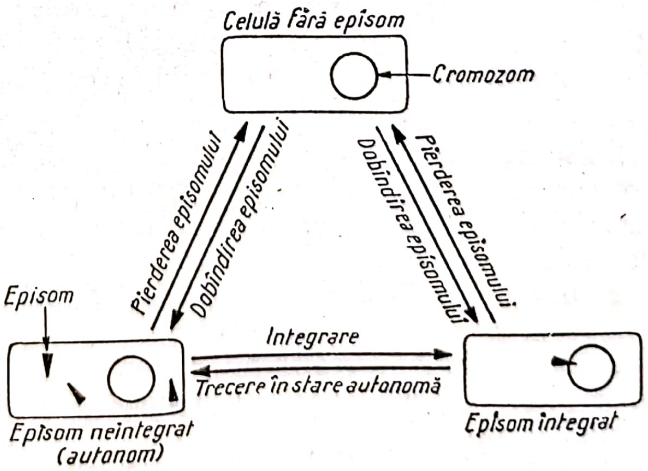


Fig. 278. Episomii bacterieni şi relaţiile lor posibile cu celula: săgeţile indică reversibilitatea acestor relaţii.

episomică, fiind numai rareori integrat în cromozom, în care caz este transmis ca o genă cromozomială.

Elementele genetice suplimentare au cîteva proprietăţi generale, şi anume:

1) Atît episomii cît şi plasmidele constau din molecule mici de ADN cu structură circulară, fiind prin aceasta echivalente unor cromozomi miniaturali. Astfel, factorul *F* conţine 5×10^5 nucleotide, iar factorul *„col"* 10^6 nucleotide.

2) Pătrunderea lor într-o celulă receptoare modifică genotipul acesteia, ceea ce se traduce prin apariţia a una sau mai multe proprietăţi fenotipice noi, ca urmare a aportului de informaţie genetică străină.

3) Structurile genetice suplimentare nu sînt indispensabile pentru supravieţuirea celulei şi, ca atare, ele pot lipsi, sînt transmisibile prin infecţie de la o celulă la alta sau pot fi pierdute, fără ca celula de origine să sufere; o excepţie în acest sens o constituie fagul temperat, care dacă nu este necesar pentru viaţa celulei, determină, în schimb, moartea ei prin liză, în momentul cînd — trecut din starea de episom integrat în aceea de episom citoplasmic — se multiplică masiv sub formă de fag litic, capabil să infecteze noi gazde.

4) Replicarea acestor structuri aflate în stare autonomă este independentă de mecanismele de control ale diviziunii celulare şi numai atunci cînd ele au trecut în stare integrată — ceea ce de altfel se poate întîmpla doar în cazul episomilor — replicarea lor este iniţiată şi controlată de cromozomul cu care fac corp comun.

5) Unele dintre aceste formaţiuni purtătoare de informaţie genetică favorizează conjugarea, proces sexual în cursul căruia se realizează propriul lor transfer ca unităţi autonome sau transferul lor în stare integrată, asociat cu acela al unor gene cromozomice. Episomii şi plasmidele care au rol în determinarea tipurilor sexuale şi care favorizează conjugarea (factorii *F*, *„col"* şi *„r"*) au fost numiţi *conjugoni* (L u r i a, 1963), *factori de sex* sau *elemente autotransferabile* (A d e l b e r g, 1966), indiferent dacă determină sau nu şi alte caractere specifice ale celulei purtătoare, cum ar fi, de exemplu, colicinogeneza sau rezistenţa la antibiotice.

6) Elementele genetice autotransferabile, ca şi cromozomul bacterian, sînt ataşate de membrana citoplasmatică prin intermediul mezozomilor; ele favorizează procesul de conjugare prin aceea că determină formarea unor receptori de conjugare la suprafaţa celulei.

Episomul „F". Descris iniţial la *E. coli* K12, episomul *„F"* sau *factorul de sex* controlează capacitatea bacteriilor de a acţiona ca donatoare de material genetic şi permite diferenţierea cîtorva tipuri de bacterii care se comportă deosebit în procesul de conjugare:

a) bacteriile F^-, lipsite de factorul *F*, echivalente unor celule femele care se comportă ca receptoare de material genetic;

b) bacteriile F^+, conţinînd episomi *F* autonomi în citoplasmă, echivalente unor celule mascule care se comportă ca donatoare de material genetic, transmiţînd factorul *F*;

c) bacteriile *Hfr* (*High frequency of recombination*=cu mare frecvenţă de recombinare), posedînd un episom *F* integrat în cromozom, considerate ca avînd un caracter de supermascul deoarece se comportă ca celule donatoare

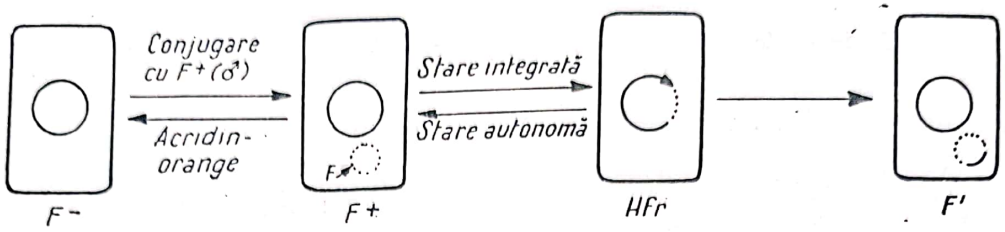


Fig. 279. Tipurile sexuale la *E. coli*.

de material genetic caracterizate printr-o foarte mare frecvenţă de conjugare şi recombinare; prezenţa episomului *F* integrat determină de obicei transferul unui număr variabil de gene cromozomice, de unde marea frecvenţă a recombinării acestui material genetic cu genomul celulei receptoare, şi numai foarte rar transferul factorului F însuşi, care este situat la extremitatea distală a cromozomului angajat în acest proces;

d) bacteriile *F'*, purtătoare ale unui episom *F'* care este un episom *F* revenit la starea autonomă după ce a încorporat în structura sa şi un fragment din cromozomul în care fusese anterior integrat, celule de asemenea cu caracter mascul, care se comportă ca donatoare de material genetic reprezentat de factorul *F'*.

Prezenţa factorului *F* conferă, prin urmare, celulelor caracterul mascul, de tip F^+, *Hfr* sau *F'*, în timp ce în lipsa acestui factor celulele bacteriele se comportă ca femele, deci ca bacterii de tip F^-.

Fagul temperat

Structură genetică de tipul episomilor, fagul temperat se poate găsi în stare *integrată*, înserat ca profag în cromozomul bacterian, sau poate trece în stare *autonomă*, în care caz replicarea lui independentă şi în ritm rapid are ca rezultat multiplicarea de fag litic, cu efect letal pentru celula-gazdă. Trecerea acestui episom de la starea sa integrată de profag la cea autonomă de fag litic — trecere realizată cu frecvenţă mică atunci cînd este spontană şi cu frecvenţă ridicată atunci cînd este indusă prin agenţi fizici sau chimici — poate fi uneori însoţită de desprinderea din cromozom a cîtorva gene adiacente, care pot fi transmise ulterior de particulele progene de fag la o altă gazdă bacteriană prin procesul de *transducţie*.

Factorii colicinogeni

Prezenţa acestor elemente genetice, considerate în genere a fi de tipul plasmidelor, determină producerea de substanţe antibiotice din grupul colicinelor, active asupra unor bacterii receptive, strîns înrudite sistematic cu cele formatoare de colicină. Celula conţinînd un factor *col* este imună faţă de colicina omologă.

Factorul de rezistenţă infecţioasă la antibiotice — factorul „r"

Factorul „r", descris iniţial de Watanabe, este un element genetic extracromozomic localizat în citoplasmă, care conferă celulei purtătoare rezistenţa la cîteva antibiotice şi la sulfamide. El constă dintr-o moleculă, probabil circulară, de ADN pe care — în cazul factorului „*r*" descris iniţial — sînt localizaţi determinanţii rezistenţei la patru substanţe antibacteriene: streptomicină, cloramfenicol, tetraciclină şi sulfamidă. Harta genetică a unui factor „r" mai cuprinde — în afara determinanţilor rezistenţei — şi un determinant genetic special, aşa-numitul *„factor de transfer al rezistenţei"*, care controlează replicarea autonomă în citoplasmă a întregului element genetic şi transferul lui la o celulă sensibilă de aceeaşi specie sau aparţinînd unei specii înrudite.

Transferul factorului de rezistenţă infecţioasă se realizează prin conjugare sau prin transducţie realizată de fagi cu dimensiuni mari. El conferă celulei receptoare, sensibilă la antibiotice, o rezistenţă concomitentă la un număr de 3 pînă la 5 antibiotice, în funcţie de numărul determinanţilor de rezistenţă prezenţi în structura factorului „*r*" transmis prin transfer.

Rezistenţa infecţioasă la antibiotice, pusă în evidenţă la bacterii Gram-negative din genurile *Shigella, Salmonella, Proteus, Escherichia* şi *Klebsiella*, se propagă în populaţia bacteriană cu o frecvenţă ridicată care contrastează vizibil cu frecvenţa joasă a instalării rezistenţei prin mutaţie (numai una din 10^7—10^8 celule). În plus, acest din urmă mod de dobîndire a rezistenţei afectează numai sensibilitatea la unul sau cel mult două antibiotice înrudite.

Pe de altă parte, eficienţa propagării rezistenţei la un grup de antibiotice prin intermediul factorului „*r*" este mult mai mare decît aceea a transmiterii caraterului de rezistenţă la un anumit antibiotic, realizată prin transformare genetică sau prin transducţie, fenomene care au loc deopotrivă cu o frecvenţă mică şi prin mijlocirea cărora este transferat numai un mic fragment de material genetic.

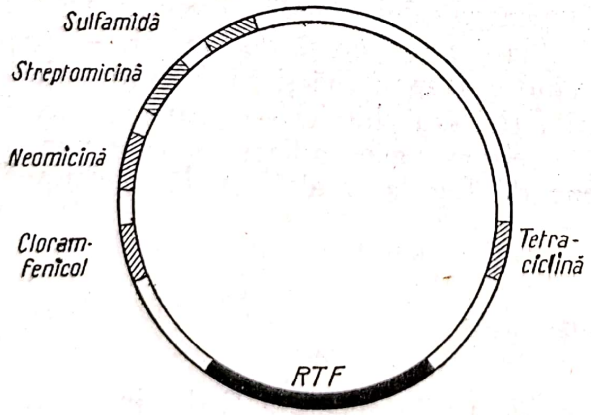


Fig. 280. Harta genetică a unui factor „r", cuprinzînd determinanţii genetici ai rezistenţei la antibiotice şi factorul de transfer al rezistenţei (RTF) (după Watanabe).

În cea ce priveşte mecanismul rezistenţei conferite de prezenţa în celulă a factorului „*r*", el pare a consta în inactivarea specifică a antibioticelor catalizată de enzimele sintetizate sub controlul determinanţilor de rezistenţă corespunzători.

Factorul „*r*" conferă bacteriilor patogene un avantaj biologic important, asigurîndu-le supravieţuirea şi multiplicarea, în ciuda prezenţei antibioticelor în organismul infectat.

Semnificaţia biologică a episomilor şi plasmidelor. Descoperirea epi-

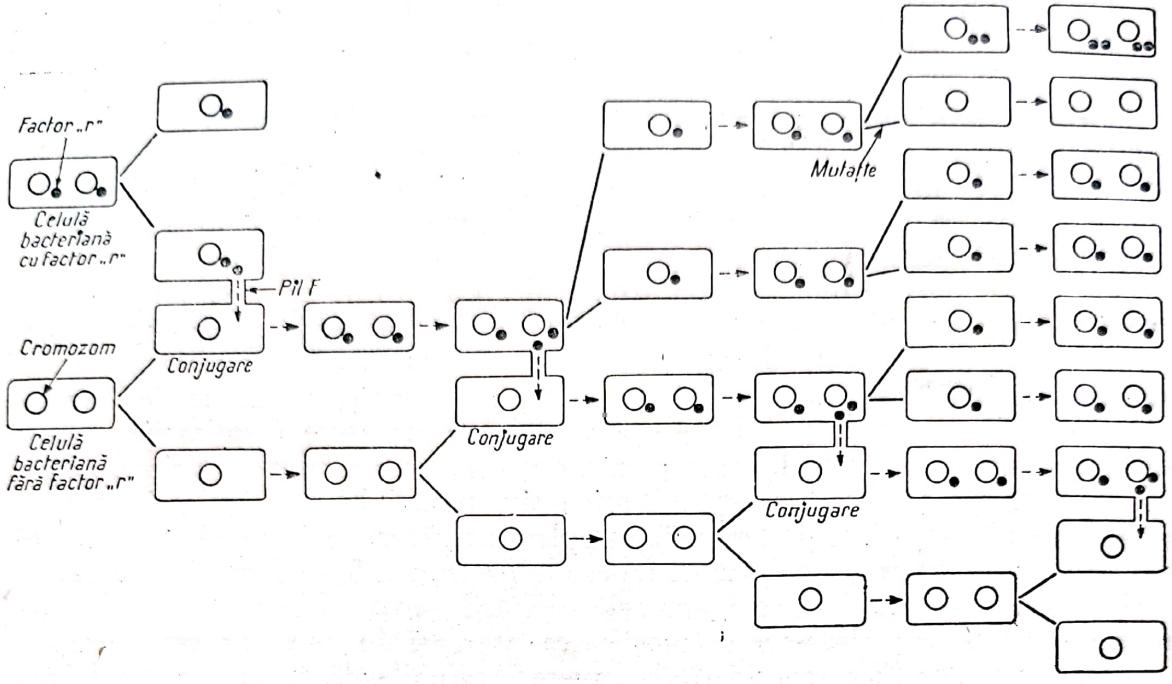


Fig. 281. Transmiterea rezistenţei infecţioase la antibiotice, implicînd transferul factorului „r" prin conjugare.

somilor şi a plasmidelor a arătat că la genomul bacterian, în mod obişnuit reprezentat prin cromozom, se pot adăuga suplimente exogene de material genetic purtătoare ale unei informaţii apte de a dirija noi reacţii biochimice cu care potenţialul metabolic al celulei se amplifică. Aceasta explică de ce celule bacteriene ereditar identice ajung să fie diferite genetic în lipsa oricărui incident mutagen.

Capacitatea structurilor de acest tip de a se multiplica rapid, atunci cînd se află în stare autonomă, şi de a controla genetic anumite procese fiziologice poate conferi gazdelor lor celulare unele avantaje vitale, cum ar fi, de exemplu, *rezistenţa la antibiotice.*

Proprietatea episomilor de a fi alternativ autonomi în citoplasmă şi integraţi în cromozom poate fi considerată ca asigurînd un mecanism special de transfer genetic prin particule citoplasmatice la un grup de organisme la care nu s-au dezvoltat nici procesele sexuale proprii fiinţelor aflate pe o treaptă filogenetică superioară, nici procesele parasexuale de tipul celor întîlnite la fungii heterocariotici. Transferul de informaţie genetică pe calea transferului de episomi ar constitui un mod de a ocoli bariera reprezentată de absenţa unor formaţiuni adaptate pentru schimbul de gene. Analizînd posibilitatea fagilor temperaţi de a transfera gene cromozomice de la o bacterie la alta, Sneath îi aseamănă funcţional cu un fel de organe sexuale primitive.

Dacă se admite unitatea fundamentală a proceselor biologice celulare, este de aşteptat ca existenţa unor structuri genetice de tipul episomilor să nu se limiteze la bacterii. Pornind de aici, conceptul de episom a fost utilizat recent pentru elaborarea unor ipoteze relativ la transformarea tumorală a celulelor.

6. REPLICAREA MATERIALULUI GENETIC ŞI REGLAREA SINTEZEI ADN. TEORIA REPLICONULUI

În timp ce *in vitro* replicarea ADN decurge anarhic, replicarea sa intracelulară se face în mod strict coordonat, datorită unor mecanisme de reglare foarte fină, deşi, spre deosebire de ceea ce se întîmplă la organismele superioare, sinteza ADN la bacterii are loc în decursul întregii perioade care separă două diviziuni celulare.

Unii dintre cromozomii intacţi izolaţi de Cairns au fost surprinşi în curs de replicare. Ei prezentau o bifurcaţie care sugerează că un cromozom se comportă ca o unitate de replicare în care un punct de creştere parcurge molecula de ADN în lungul ei. Acest punct de creştere, numit de unii cercetători — din cauza formei lui — *bifurcaţie de replicare* (*replicating fork*), determină prin înaintarea lui formarea a două noi duble catene: la fiecare dintre cele două catene care se separă progresiv după iniţierea replicării se ataşează cîte o catenă nou-sintetizată, complementară, pe măsură ce punctul de creştere avansează în lungul dublei molecule parentale. Spre deosebire de structurile liniare de ADN, care în cursul replicării capătă forma literei *Y*, cromozomii bacterieni circulari se menţin ca atare şi în cursul acestui proces, capetele catenelor-fiice (considerînd „capete" regiunile de pe cromozomul inelar unde începe şi unde se încheie replicarea) rămînînd în continuare nedesfăcute. După Cairns, replicarea începe într-un punct unic, determinat al cromozomului bacterian şi aceasta chiar în cazul cînd ar exista mai multe asemenea puncte potenţiale, deoarece activarea unuia dintre ele le anihilează implicit pe celelalte. Ea progresează regulat de-a lungul dublei catene de ADN, pînă cînd se ajunge la punctul de plecare iniţial, după care urmează separarea şi îndepărtarea între ei a celor doi cromozomi-fii rezultaţi din acest proces. În condiţii normale, un nou ciclu de replicare nu poate începe înainte ca precedentul să fi fost terminat.

Deşi cele două catene ale moleculei de ADN sînt opuse ca polaritate, replicarea *in vivo* pare să se facă în aceeaşi direcţie de-a lungul amîndorura. În acest caz, punctul la care începe replicarea are două funcţii esenţiale, şi anume: *a*) deschide dubla elice prin ruperea punţilor de H, ceea ce permite catenelor astfel separate să acţioneze fiecare ca matriţă pentru formarea catenelor com-

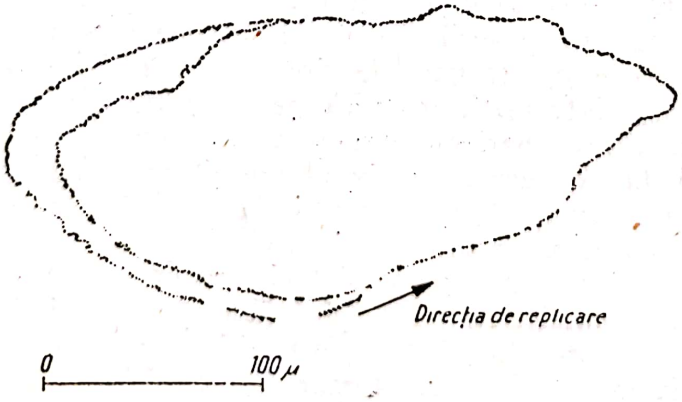


Fig. 282. Reprezentare schematică, după radioautografie, a cromozomului *E. coli* în curs de replicare.

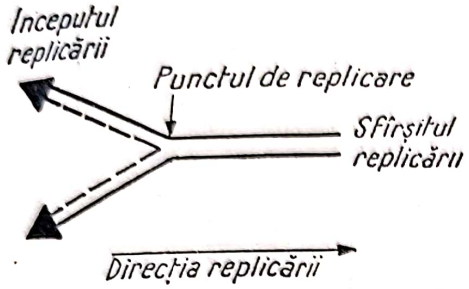


Fig. 283. Model general de replicare ADN (după Yoshikawa şi Jueoka). Pe măsura progresiunii punctului de replicare, concomitent cu separarea treptată a catenelor dublei molecule originare *(linii continue)* are loc şi sinteza noilor catene complementare *(linii punctate)*.

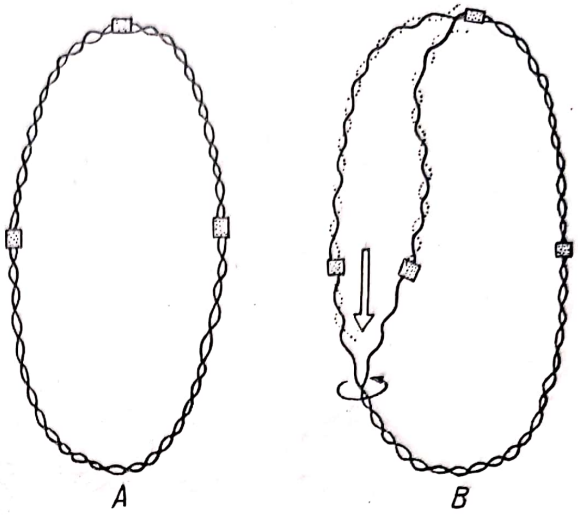


Fig. 284. Replicarea cromozomului bacterian după Cairns. *A* — cromozomul normal: pătratele indică regiuni ipotetice putînd acţiona ca replicatori; *B* — cromozom în curs de replicare: săgeata dublă indică direcţia replicării, iar cea simplă locul unde molecula helicală începe să se deruleze printr-un mecanism de „pivot". Catenele nou sintetizate sînt trasate în linie întreruptă.

plementare; *b)* acţionează ca un adevărat „pivot" *(swivel)*, a cărui funcţie, impusă de forma circulară a cromozomului, constă în a determina descolăcirea regiunii încă nereplicate prin imprimarea unei rotaţii de sens opus faţă de rotaţia uneia dintre cele două ramuri ale bifurcaţiei.

În ceea ce priveşte fragmentele de ADN cromozomic exogen, transferate în celulele bacteriene prin procese ca transformarea, transducţia sau conjugarea, s-a demonstrat că ele nu se pot replica independent în noua lor gazdă, ci numai după recombinarea cu structurile genetice ale bacteriei receptoare.

Toate aceste fapte, care dovedesc existenţa unei ordini strict determinate în replicarea materialului genetic, implică acţiunea unui sistem de reglare foarte riguros, întrucît o replicare unitară nu poate fi concepută în lipsa unei reglări precise şi adecvate, la fel de unitară.

În concepţia lui Jacob şi Monod, fiecare structură genetică, cromozom nuclear ori episom autonom sau plasmidă din citoplasmă, este capabilă de replicare independentă, constituind astfel o unitate de replicare sau *replicon*. Orice asemenea unitate de replicare are aptitudinea de a determina intrarea în funcţie a unui circuit de reglare specific cu funcţie de control genetic asupra replicării structurii respective în coordonare cu diviziunea celulară. Această ipoteză se bazează pe observaţiile făcute asupra unor episomi ai *E. coli*, factorul *F* şi fagul *lambda* (λ) de lizogenie, care se replică independent dacă se află în stare autonomă în citoplasma bacteriei, în timp ce atunci cînd sînt integraţi în cromozomul bacterian se supun reglării care dirijează replicarea acestuia.

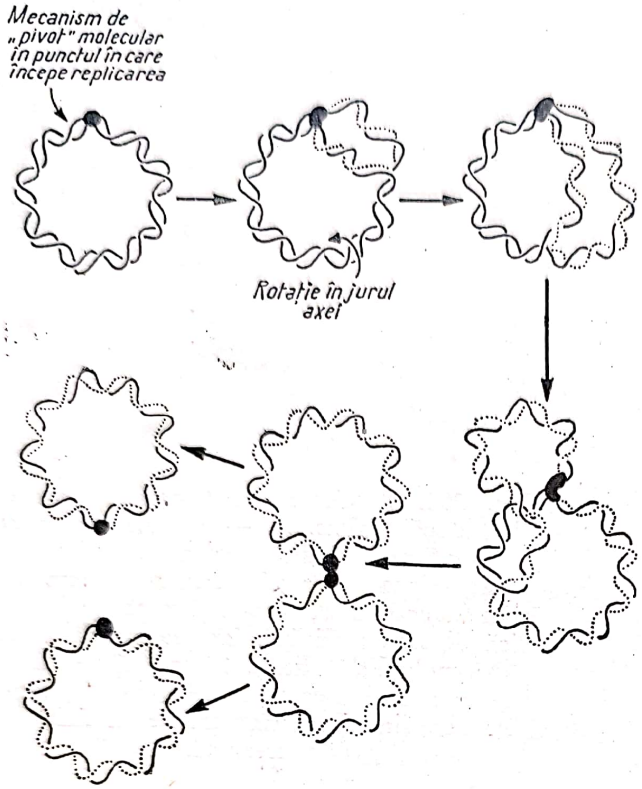


Fig. 285. Model de replicare al unei molecule circulare de ADN. Sinteza începe dintr-un anumit punct și înaintează totdeauna în aceeași direcție. Molecula helicală parentală se rotește pe măsură ce catenele ei se separă prin mecanismul de „pivot" molecular acționînd în punctul în care începe replicarea.

Una și aceeași unitate genetică, în cazul de față episomul, se poate deci replica în ritmuri diferite, în funcție de sistemul de reglare căruia îi este supusă. După ipoteza repliconului, fiecare unitate de ADN, cromozom sau episom, are în structura sa determinanți genetici specifici a căror exprimare guvernează replicarea autonomă a unității respective. În cazul în care două asemenea unități diferite fuzionează, replicarea noii unități rezultate prin recombinare este guvernată de determinanții uneia dintre componentele de origine. Astfel, de exemplu, replicarea profagului integrat în cromozom este dirijată de determinanți cromozomici, în timp ce aceea a genelor cromozomice atașate la episomul autonom *F'* este guvernată de determinanți episomici.

Sistemul care guvernează replicarea unei unități genetice este alcătuit din cel puțin două elemente: un *inițiator* și un *replicator*.

Inițiatorul este un produs specific, difuzibil, probabil de natură proteică, avînd rolul de activator în declanșarea replicării. Sinteza lui este efectuată

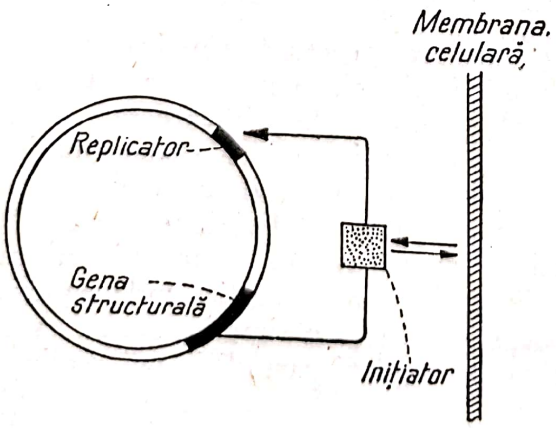


Fig. 286. Modelul lui Jacob și Brenner pentru reglarea activității unei replicări.

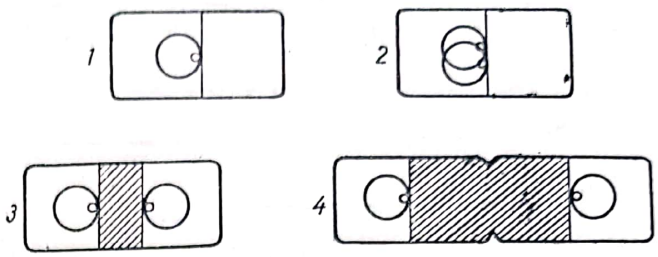


Fig. 287. Rolul membranei citoplasmatice şi al mezozomilor în diviziunea celulei bacteriene:

1 — cromozomul bacterian legat de membrană; *2* — replicarea lui iniţiată de un stimul pornit de la nivelul acesteia; *3* — răsucirea lentă a fiecăruia dintre cromozomi, de o parte şi de alta a locului său de inserţie urmată de creşterea membranei celulare; *4* — formarea septului transversal care asigură segregarea materialului genetic progen şi separarea celor două celule-fiice (după Jacob).

sub controlul unei gene din structura repliconului respectiv. Iniţiatorul este receptiv la semnale chimice citoplasmatice emise în urma a diferite activităţi celulare şi, pe de o parte, are capacitatea de a „recunoaşte" un alt segment particular al repliconului, replicatorul, la nivelul căruia începe replicarea.

Replicatorul este o structură genetică specifică, nedifuzibilă, care, înscrisă în secvenţa repliconului respectiv, este analogă genei denumite „operator" implicată în biosinteza proteinelor. El reprezintă un element structural care poate fi „recunoscut" de iniţiatorul din acelaşi replicon. Pe măsură ce celula se apropie prin dezvoltarea sa de momentul diviziunii, iniţiatorul primeşte semnale chimice de la nivelul membranei citoplasmatice şi activează replicatorul, declanşînd astfel replicarea secvenţială a întregii molecule de ADN. Cînd ciclul de replicare este încheiat, punctul de replicare ajunge din nou la nivelul replicatorului, întrucît orice replicon este circular. Pentru începerea unui nou ciclu de replicare este necesară o nouă sinteză de iniţiator şi o nouă reacţie de activare a replicatorului de către iniţiator.

7. COORDONAREA REPLICĂRII ADN CU DIVIZIUNEA CELULARĂ ŞI SEGREGAREA MATERIALULUI REZULTAT DIN REPLICARE

La sfîrşitul procesului de diviziune, fiecare celulă-fiică este înzestrată cu o copie exactă a genomului celulei parentale. Spre deosebire de celulele eucariote, la care segregarea materialului genetic se face prin migrarea lui polară în cursul anafazei, în celulele bacteriene procariote acest fenomen se poate explica numai admiţînd că toate structurile genetice, cromozomi şi episomi, sînt legate de membrana citoplamatică. Pe microelectronografii în serie, Ryter şi Jacob (1963) demonstrează la *B. subtilis* existenţa unei asemenea legături stabilite prin intermediul unor structuri — denumite *mezozomi* — provenind din invaginarea membranei citoplasmatice. În aceste formaţiuni se găsesc, ca şi în membrana citoplasmatică însăşi, sisteme enzimatice generatoare de enegie.

Contactul strîns între nucleu şi mezozom se menţine în tot timpul ciclului de viaţă al celulei bacteriene, exceptînd stadiul ei de spor, în care mezozomii dispar iar nucleul sporului ajunge în contact direct cu membrana. Legătura dintre cromozom şi mezozom este deosebit de puternică, aşa cum o arată faptul că în cursul plasmolizei mezozomul, progresiv devaginat sub acţiunea

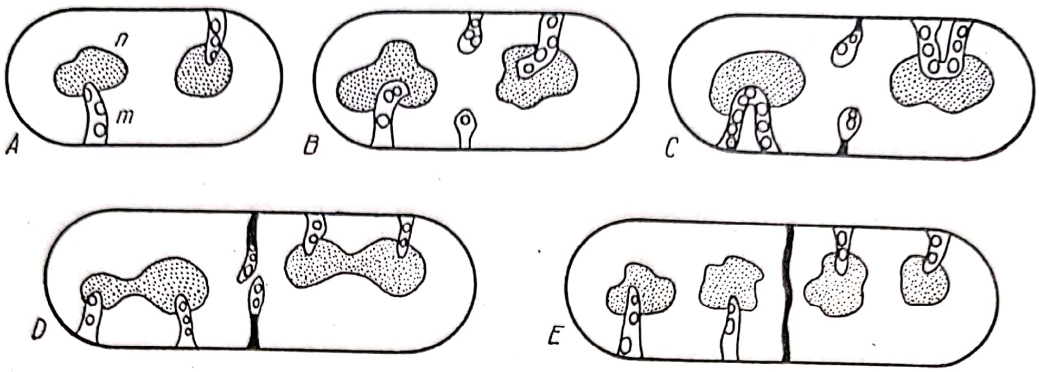


Fig. 288. Reprezentarea schematică a ciclului de diviziune la *B. subtilis:*
A — Materialul nuclear (*n*) este legat de membrana citoplasmatică prin intermediul unui mezozom (*m*); *B* — nucleii se măresc, între ei apar mezozomii care vor forma septul transversal; *C* — mezozomii nucleari se divid şi se îndepărtează; formarea septului transversal continuă; *E* — septul transversal este complet; celulele-fiice conţin doi nuclei.

forţelor osmotice, trage după el cromozomul care ajunge astfel să fie direct alipit de membrana citoplasmatică.

Segregarea consecutivă replicării nu se face la întîmplare, ci coordonat: cei doi cromozomi sau episomi nou formaţi sînt separaţi prin dedublarea mezozomului iniţial, astfel încît fiecare dintre ei rămîne ataşat de cîte un mezozom fiu. Mezozomii rezultaţi din dedublarea celui parental se separă încet unul de altul, antrenînd fiecare repliconul ataşat de el, graţie sintezei progresive de membrană citoplasmatică prin care se creează septul transvers de diviziune.

Unitatea de segregare la bacterii este reprezentată, prin urmare, de membrana citoplasmatică sau de formaţiuni derivate din ea — mezozomii — de care sînt fixaţi repliconii celulari. Pentru ca replicarea ADN să fie coordonată cu diviziunea celulară, este necesar ca la nivelul zonei de fixare a repliconilor să acţioneze semnale care pot opri sau declanşa replicarea. În felul acesta, reproducerea materialului genetic este corelată cu creşterea celulară prin intermediul semnalelor chimice transmise de membrana citoplasmatică în creştere la sistemul enzimatic de reglare a replicării de la nivelul genomului.

8. GENELE

Genomul bacterian sau viral este alcătuit din gene dispuse succesiv în lungul moleculei de ADN sau, la unele virusuri, de ARN.

În concepţia clasică, gena era definită drept unitatea de material genetic transmisibilă de la părinţi la descendenţi, unitate care poate fi caracterizată prin trei proprietăţi esenţiale: *a*) comportarea ei ca o entitate în determinarea unui anumit caracter fenotipic; *b*) răspunsul ei ca un întreg la acţiunea agenţilor mutageni şi *c*) capacitatea ei de recombinare cu unităţi omologe (Braun, Stent, Ravin). Ea ar fi deci o parte cu limite bine definite a cromozomului, asociată cu alte gene, dar comportîndu-se ca o unitate de funcţie, de mutaţie şi de recombinare.

În concepţia actuală, ilustrată de definiţia lui Watson, gena este o mică porţiune a cromozomului răspunzătoare de sinteza unui produs celular specific

şi constă dintr-o grupare liniară de subunităţi — potenţial susceptibile ele înseşi de mutaţie — care pot exista fiecare în mai multe stări alternative şi care pot suferi procese de recombinare genetică de tip *crossing-over*. *Gena reprezintă, prin urmare, o porţiune din genomul total constituit din ADN*, şi anume o secvenţă de nucleotide care se comportă ca determinantul unui caracter unic, dar care de fapt are o structură complexă, întrucît *este purtătoarea informaţiei genetice* necesare pentru întreaga succesiune de reacţii implicate în sinteza unui lanţ polipeptidic specific din punct de vedere funcţional. Funcţiile genei nu sînt, prin urmare, proprietăţi ale unei structuri simple şi indivizibile, ci sînt atribute ale unor unităţi infragenice distincte, componente ale unei structuri complexe (B e n z e r).

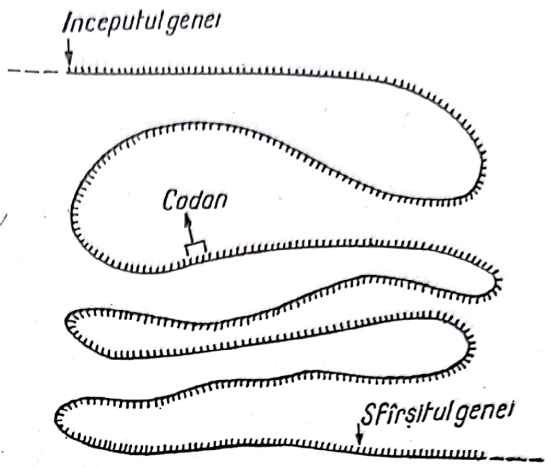


Fig. 289. Reprezentarea schematică a unei gene mici. Fiecare linie perpendiculară corespunde unei baze (respectiv nucleotid). Grupul de trei baze formează un codon (după Crick).

Cercetările de genetică bacteriană şi virală au adus date permiţînd identificarea a trei tipuri de unităţi infragenice: *cistronul, mutonul* şi *reconul*.

1) *Unitatea de funcţie (cistronul)*. Capacitatea de a determina independent sinteza unui polipeptid corespunde, după B e n z e r, unui segment de material genetic — cistronul — cuprinzînd cîteva sute de unităţi minime de recombinare şi mutaţie. O genă poate fi uneori compusă din doi sau mai mulţi cistroni. Cei doi cistroni *A* şi *B* ai fagului T_4 analizaţi în amănunt sînt formaţi din aproximativ 1 700 şi, respectiv, 1 100 perechi de nucleotide din dubla elice de ADN viral.

În esenţă, genele sau determinanţii genetici specifică deci prin activitatea lor un anumit caracter dat. Ca atare, fiecare proteină specifică a unei celule sau a unui virus este determinată de o anumită genă, funcţia oricărei gene limitîndu-se, pe de altă parte, cu foarte puţine excepţii, la determinarea structurii unei singure proteine specifice (A d e l b e r g).

2) *Unitatea genetică de mutaţie (mutonul)*. Analiza alterării prin mutaţie a genomului fagic a dovedit existenţa unor modificări afectînd lanţul nucleotidic de ADN pe lungimi variabile, corespunzătoare unui singur nucleotid, în cazul mutaţiilor punctiforme, sau mai multora, mergînd chiar pînă la sute sau mii de nucleotide, în cazul deleţiilor. Acţiunea mutagenă la nivelul unui singur punct de pe harta genetică a celulei, care are ca efect apariţia unei mutaţii punctiforme, se exercită asupra unui singur nucleotid, a cărui alterare este urmată de modificarea corespunzătoare a omologului său de pe catena complementară din dubla elice de ADN. Cea mai mică unitate mutaţională sau mutonul este deci nucleotidul individual.

3) *Unitatea genetică de recombinare (reconul).* Studiind mutantele „*r*" ale fagului T_4, Benzer a ajuns la concluzia că noţiunea clasică de genă este inadecvată pentru studiul şi înţelegerea structurii fine a genomului viral. Cercetările sale au demonstrat că prin recombinare genetică se pot pune în evidenţă şi individualiza în genomul fagic locuri genetice care sînt funcţional distincte chiar atunci cînd constau din nucleotide vecine în macromolecula de ADN. Unitatea de recombinare sau *reconul* este, prin urmare, nucleotidul individual.

Dimensiunile genelor. O genă corespunde, în medie, după Watson, la o succesiune liniară de peste 1 500 de perechi de nucleotide. În această apreciere se ţine seama de faptul că greutatea moleculară a unei perechi de baze este cu puţin mai mare de 600 şi că, probabil, multe gene nu au fost încă identificate pe hărţile genetice ale organismelor respective, astfel că numărul cunoscut este mai mic decît numărul lor real.

Determinarea aproximativă a mărimii unei gene se face împărţind greutatea moleculară a ADN dintr-un cromozom la numărul de gene identificate pe el. De exemplu, la fagul T_4 greutatea moleculară a ADN este de 120 milioane ($1{,}2 \times 10^8$), ceea ce echivalează cu 50 de gene avînd greutatea moleculară individuală de 2,4 milioane, corespunzătoare la 4 000 de perechi de nucleotide. La fagul λ greutatea moleculară a ADN este de 32 milioane ($3{,}2 \times 10^7$), ceea ce corespunde la circa 20 de gene identificate pînă în prezent, cu o greutate moleculară individuală de 1,5 milioane, echivalentă aceleia a circa 2 500 de nucleotide.

9. CODUL GENETIC

Ipoteza că genele conţin „informaţia" genetică necesară pentru creşterea şi reproducerea celulei se bazează pe presupunerea că aceste entităţi poartă în structura lor, înscrise sub formă codificată, planurile de construcţie a miilor de tipuri de proteine servind celulei ca material de bază pentru creştere, refacerea unor structuri şi multiplicare, ca şi pentru obţinerea de energie. Demonstrarea structurii moleculare a materialului genetic a permis să se stabilească modul în care el „deţine" informaţia sub formă codificată, felul în care mesajul codificat este „transcris" pentru a fi transmis de la locul său de

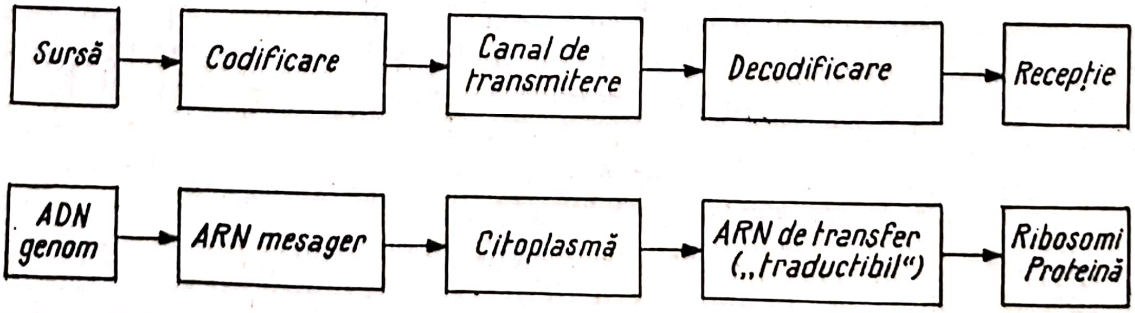


Fig. 290. Schema generală a unui sistem de transmitere a informaţiei (*sus*) şi schema de transmitere a informaţiei genetice în celula bacteriană (*jos*).

origine, genomul, la „maşinăria" sau „dispozitivul" *(machinery)* care face sinteza proteinelor în celulă, precum şi modul în care mesajul „transcris" poate fi „citit" şi „tradus" la acest nivel.

Funcţia codului genetic poate fi asemănată, în ultimă instanţă, cu procesul de transmitere a unei informaţii codificate de la „sursă", respectiv structura biochimică a genomului constînd din ADN sau ARN, pe anumite „canale", la locul de „recepţie" unde mesajul este decodificat (tradus) şi folosit, în cazul activităţilor celulare, în procesul de biosinteză a proteinelor.

Pentru explicarea teoriei codului genetic se recurge de obicei la analogia cu un limbaj care urmează a fi tradus în alt limbaj. Astfel, se admite că proprietăţile genetice ale tuturor organismelor sînt codificate într-un limbaj foarte simplu, al cărui alfabet este constituit din numai patru litere — *A, G, C, T* [1] — corespunzătoare bazelor din cele patru nucleotide care intră în constituţia ADN. Molecula acestui acid nucleic reprezintă, prin urmare, un adevărat cod molecular submicroscopic. Sensul sau semnificaţia unui asemenea limbaj este determinat de succesiunea specifică a celor patru baze de-a lungul moleculei de ADN, iar complexitatea lui este proporţională cu mărimea moleculei, deci a genomului purtător de informaţie. Această complexitate este foarte diferită: după Beadle, ea variază între limitele a 5 000 de „litere", deci baze, la virusurile cele mai mici, şi 5 miliarde „litere", la om. [2]

Descifrarea codului genetic înseamnă stabilirea modului în care un limbaj bazat pe patru litere poate alcătui un cod de 20 de cuvinte, corespunzînd celor 20 de aminoacizi naturali din structura proteinelor care, la rîndul lor, pot fi definite printr-un limbaj redat prin 20 de litere. Codul genetic reprezintă, prin urmare, nu numai mesajul însuşi înscris în genom, ci şi „dicţionarul" necesar „traducerii" limbajului de patru litere al ADN în limbajul de 20 de litere al proteinelor.

Funcţia codului genetic constă deci în conservarea criptografică a informaţiei genetice şi transmiterea de la sursă — genomul — la receptorul reprezentat de structurile cu funcţie de efector care sînt ribosomii. Analogia cu schemele de transmitere a informaţiei în general este evidentă.

Structura codului genetic. Structura codului genetic este determinată de secvenţa specifică a celor 4 baze *(A, T, C* şi *G)* cu care se pot face 4^n permutări (n=numărul de nucleotide dintr-o moleculă dată), ceea ce practic permite codificarea unui număr enorm de mesaje genetice. Ca atare, numărul posibil de gene cu o greutate moleculară de 10^6 alcătuite din 1 500 nucleotide este de circa 4^{1500}, ceea ce reprezintă o valoare cu mult mai mare decît numărul de gene care au existat în toţi cromozomii de la apariţia vieţii şi pînă acum (Watson). Bazele se repetă deci de-a lungul moleculei ADN,

[1] Deşi unitatea de bază a ADN este nucleotidul, literele uzuale de cod sînt cele care corespund denumirii prescurtate a bazelor, deoarece ceilalţi doi constituenţi — pentoza şi fosfatul — sînt identici la toate nucleotidele.

[2] După calculele aproximative ale lui Beadle, 5 miliarde de litere corespund unei cantităţi de informaţie echivalentă cu 1 miliard 700 milioane de cuvinte de trei litere, ceea ce reprezintă 600 mii de pagini de tipar sau 1 000 de volume obişnuite cu circa 500 de cuvinte engleze pe o pagină.

Codon = literă unică (Cod „singlet") (4 cuvinte)	Codon = două litere (Cod „dublet") (16 cuvinte)				Codon = trei litere (Cod „triplet") (64 cuvinte)			
A	AA	AG	AC	AU	AAA	AAG	AAC	AAU
G	GA	GG	GC	GU	AGA	AGG	AGC	AGU
C	CA	CG	CC	CU	ACA	ACG	ACC	ACU
U	UA	UG	UC	UU	AUA	AUG	AUC	AUU
					GAA	GAG	GAC	GAU
					GGA	GGG	GGC	GGU
					GCA	GCG	GCC	GCU
					GUA	GUG	GUC	GUU
					CAA	CAG	CAC	CAU
					CGA	CGG	CGC	CGU
					CCA	CCG	CCC	CCU
					CUA	CUG	CUC	CUU
					UAA	UAG	UAC	UAU
					UGA	UGG	UGC	UGU
					UCA	UCG	UCC	UCU
					UUA	UUG	UUC	UUU

Fig. 291. Natura obligatoriu „tripletă" a codului genetic dedusă din necesitatea existenţei a minimum 20 cuvinte de cod corespunzînd celor 20 aminoacizi naturali.

aşa cum se repetă literele unui alfabet de-a lungul frazelor unei cărţi, în tot felul de combinaţii.

Aşa după cum ordinea literelor dă sensul unui text, ordinea particulară a bazelor (corespunzînd celor patru litere *A*, *T*, *C* şi *G*) determină caracteristicile moleculei ADN.

Problema care se pune este însă aceea a asocierii celor patru baze pentru ca fiecare combinaţie să se traducă prin informaţia corespunzătoare unuia dintre cei 20 de aminoacizi din constituţia proteinelor. Presupunînd că toate unităţile fundamentale de codificare denumite *codoni* au aceeaşi lungime, secvenţa minimă capabilă să codifice un aminoacid constă din 3 baze *(cod triplet)*. Într-adevăr, dacă unui aminoacid i-ar corespunde un singur nucleotid nu ar fi posibilă decît codificarea a 4 aminoacizi, iar un *cod dublet*, în care un aminoacid ar fi specificat de un codon alcătuit din 2 nucleotide, nu ar putea codifica decît 4^2, adică 16 aminoacizi. Codul triplet asigură formarea a 64 de cuvinte (4^3), adică mai mult decît este necesar pentru specificarea celor 20 de aminoacizi naturali. Tripletele suplimentare nu sînt inactive, ci au şi ele diferite semnificaţii biologice.

În acord cu această concepţie, o genă obişnuită de dimensiuni medii, alcătuită din 1 500 de perechi nucleotide, este subdivizată în 500 de unităţi de citire sau codoni, care specifică fiecare cîte un aminoacid. Aceasta permite codificarea unei proteine de mărime medie, cu o greutate moleculară de 30—50 000, alcătuită din 300—500 de aminoacizi.

Dovezi biologice în favoarea realităţii codului triplet. Natura tripletă a codului genetic a fost demonstrată de Crick în 1961, cu ajutorul mutaţiilor induse la fagul T_4 la nivelul locusului cromozomic *„rII"*. Experienţele acestui cercetător s-au bazat pe faptul că tratarea cu acridină determină în molecula de ADN modificări constînd fie în *adiţie* (adăugarea unei baze noi), fie în *deleţie* (suprimarea uneia dintre bazele existente), ceea ce are ca rezultat apariţia unor mutante + sau — în funcţie de tipul de modificare mutaţională. Mutantele de tip *rII* astfel obţinute pot reveni la fenotipul sălbatic originar printr-o modificare de sens opus survenită în alt punct al locusului respectiv de pe cromozom.

Producerea mutaţiilor de tipul adiţie sau deleţie duce în general la apariţia unor gene fagice complet nefuncţionale, în sensul că produsul proteic cu caracter enzimatic codificat de o asemenea genă este atît de profund alterat încît nu mai este capabil să catalizeze sinteza unei anumite proteine de către bacteria-gazdă infectată cu fagul mutant. Dimpotrivă, dacă mutaţia se produce prin simpla substituire a unui singur nucleotid, gena mutantă — denumită *lcakv* — rămîne capabilă să codifice sinteza proteinei — enzimă corespunzătoare, dar aceasta are numai o activitate slabă, ca rezultat al înlocuirii unui aminoacid din molecula ei cu un altul.

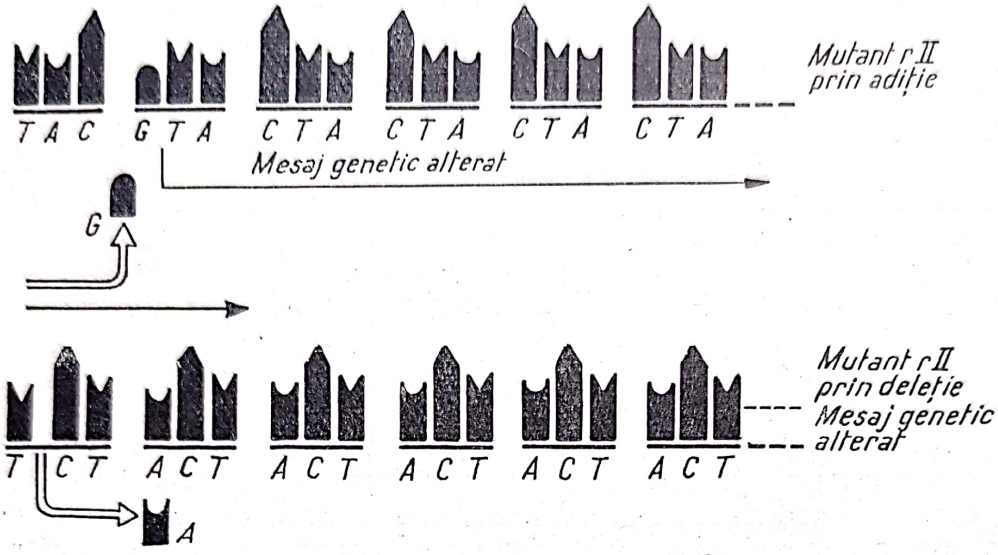
Diferenţa calitativă dintre cele două tipuri de mutaţii — adiţie şi deleţie, pe de o parte, şi substituţie, pe de altă parte — este determinată de un factor cantitativ, şi anume ordinea strict determinată numeric în care se face „citirea" mesajului genetic: începută la un capăt al moleculei de ADN, ea se face succesiv pe grupuri de cîte trei litere sau baze. Adiţia sau deleţia, prin care numărul total al bazelor se modifică în plus sau în minus, schimbă modul de grupare a literelor în triplete şi, ca atare, modifică sensul întregului mesaj; dimpotrivă, simpla substituire a unui nucleotid cu un altul, nu antrenează decît schimbarea sensului unui singur codon într-un mesaj genetic care rămîne nemodificat ca număr total de litere, deci ca ordine de citire a literelor ce alcătuiesc tripletele.

Analiza genetică a diferitelor tipuri de mutante selecţionate de Crick şi colab. ilustrează cele expuse mai sus.

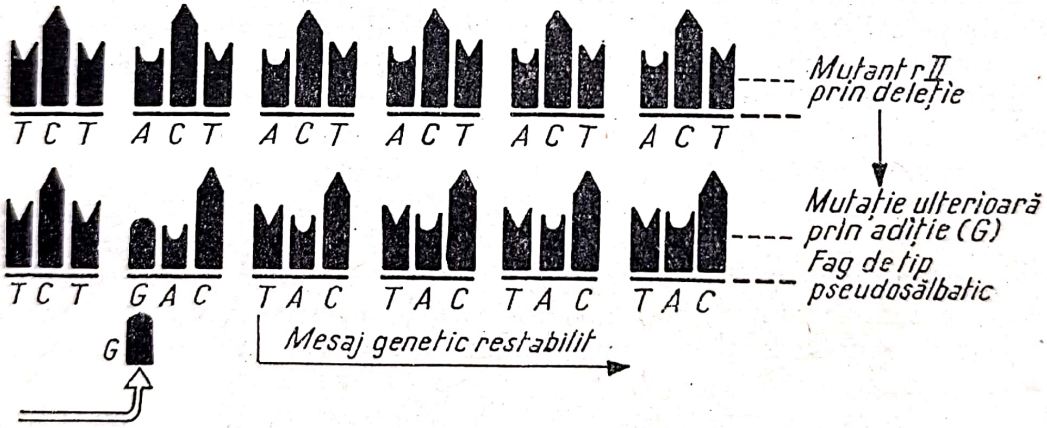
Presupunînd că secvenţa normală a bazelor este:

citirea informaţiei se face de la stînga la dreapta în cuvinte de cîte 3 litere, adiţia sau deleţia unei baze încurcă citirea corectă a întregii secvenţe, ceea ce

se traduce prin apariţia unui fenotip mutant *rII*, incapabil să mai infecteze *E. coli* K 12.

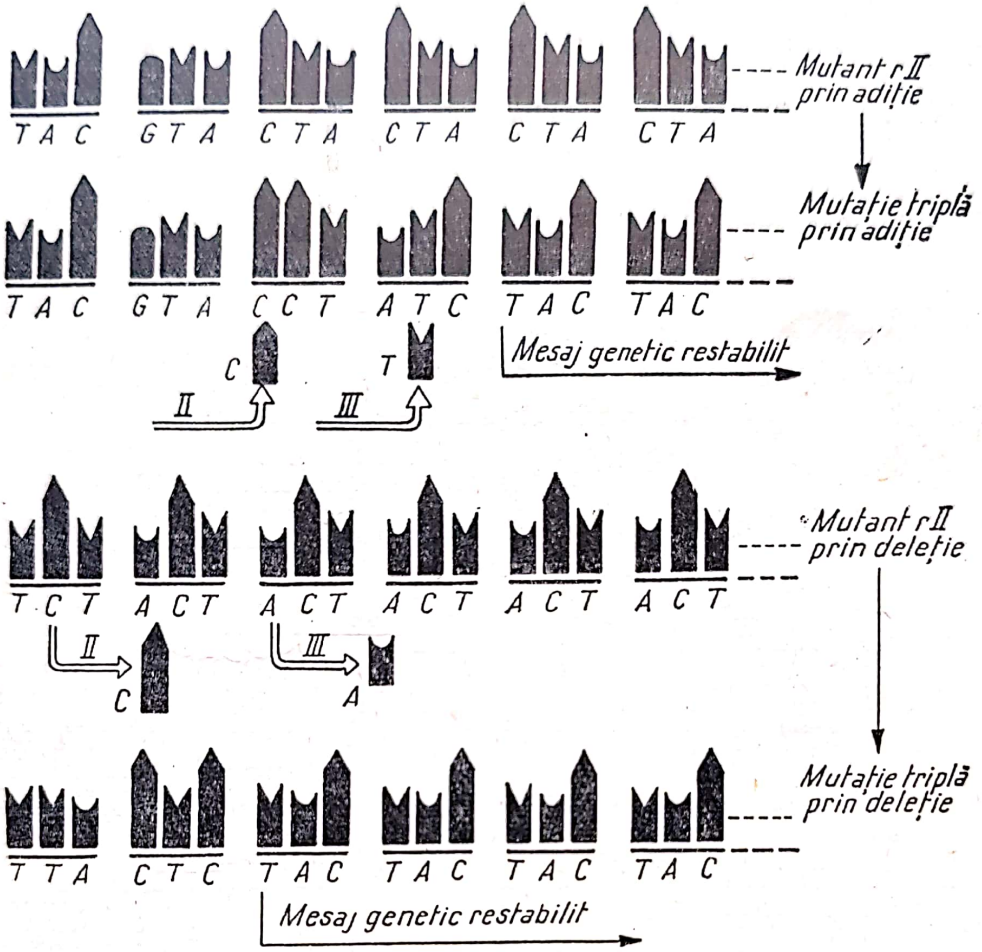


Dacă o tulpină mutantă, de exemplu mutanta prin delecţie, suferă, la rîndul ei, o mutaţie spontană, de astă dată prin adiţie, adăugarea bazei noi restabileşte sensul mesajului genetic dincolo de locul ei de inserţie.



Mutantele duble prin adiţie (+ +) sau deleţie (— —) îşi menţin însă fenotipul mutant *rII*. În schimb, la mutantele triple (+ + + sau — — —), care conţin 3 baze suplimentare sau care au pierdut 3 baze, numărul total al bazelor rămîne multiplu de 3, deci succesiunea lor normală se poate restabili începînd de la sediul ultimei mutaţii, ceea ce se traduce printr-un fenotip similar celui normal. Într-adevăr, reluînd primele două exemple — cele două mutante *rII* care au suferit deja una o adiţie şi alta o deleţie — se observă că dacă fiecare dintre ele mai este încă de două ori modificată prin adiţie şi, respectiv, prin deleţie, mesajul lor genetic originar se restabileşte după cea de-a

treia mutaţie, şi anume dincolo de locul unde s-a produs ultima adiţie sau deleţie.



O asemenea comportare nu poate fi explicată decît dacă se admite că un codon constă din 3 litere. Citirea mesajului purtat de un astfel de cod triplet nu se poate face decît tot pe grupe de cîte 3 baze. Adăugarea sau suprimarea uneia dintre baze face ca mecanismul de citire să devină complet defazat, în sensul că toţi aminoacizii corespunzînd porţiunii de genă de după locul unde a survenit modificarea vor fi codificaţi de triplete modificate, cu excepţia cîtorva care întîmplător ar putea avea încă un sens normal. Dacă gena alterată prin mutaţie mai poate codifica sinteza unei proteine, aceasta va fi atît de modificată încît funcţional semnificaţia ei va fi pierdută sau va deveni cu totul alta decît cea originară.

Pentru a rezuma, adăugarea la o adiţie a unei deleţii nu prea îndepărtate pe harta genetică restaurează parţial funcţia genetică modificată prin mutaţie — aşa cum se vede din exemplul de mai sus, relativ la restabilirea mesajului genetic al fagului de tip pseudosălbatic — în timp ce survenirea a două adiţii sau a două deleţii în aceeaşi unitate de funcţie face inactivă această unitate. În cazul însă cînd se succed trei mutaţii de acelaşi sens (+ + + sau — — —),

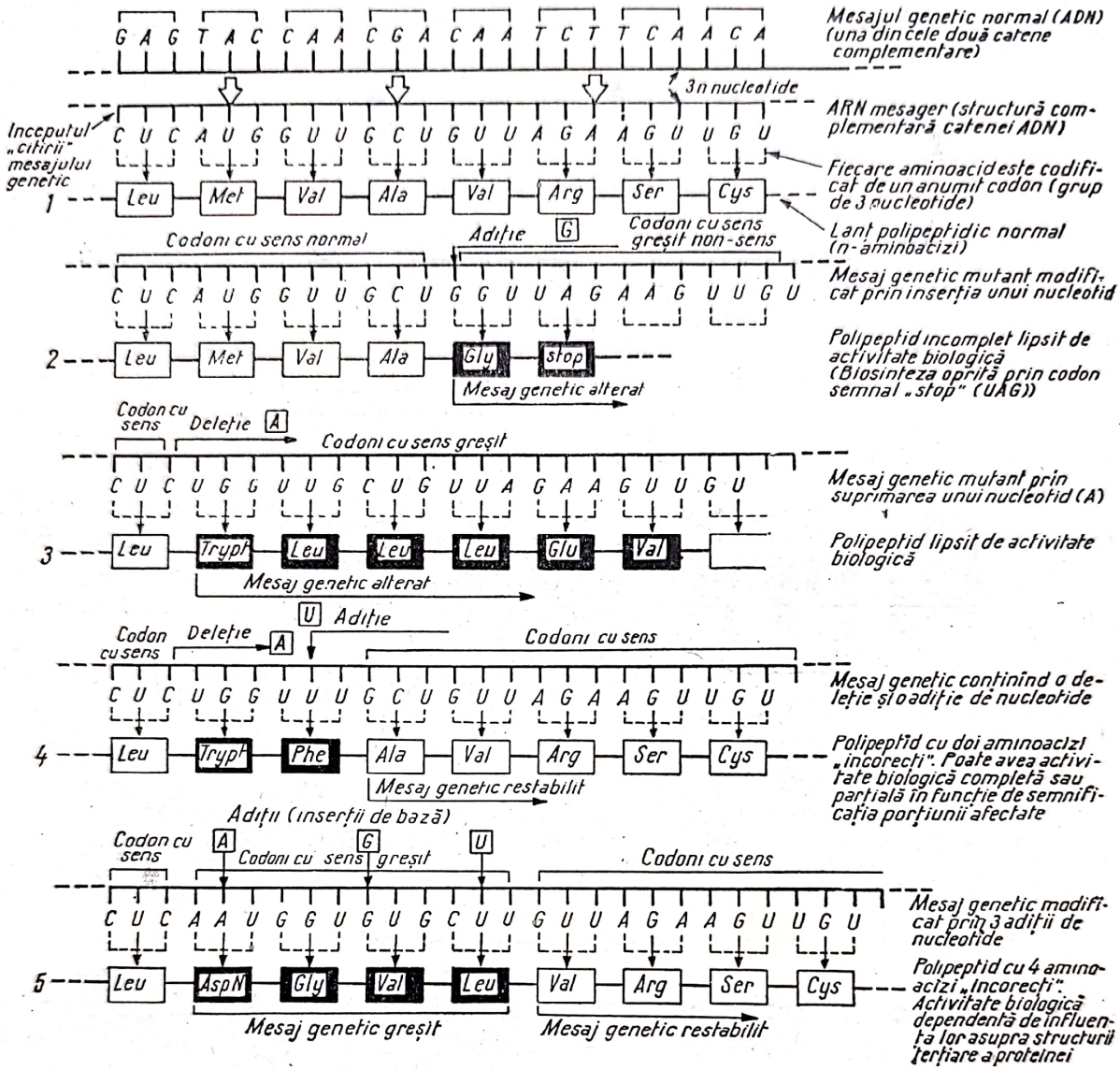


Fig. 292. Demonstrarea caracterului „triplet" al codului genetic prin efectul pe care mutațiile constînd din adăugarea sau suprimarea unuia sau mai multor nucleotide în molecula ADN, îl exercită asupra modului în care este „citit" mesajul genetic și asupra secvenței aminoacizilor în produsul polipeptidic al unei gene.

funcția genei mutante se restabilește, deoarece dincolo de sediul ultimei mutații sensul normal al citirii mesajului este reconstituit și astfel cea mai mare parte a secvenței aminoacizilor din proteina codificată de această genă corespunde celei normale. Aceasta constituie dovada experimentală a ipotezei codului triplet, conform căreia unitatea de codificare sau codonul constă dintr-un număr de unități egal cu 3 sau cu un multiplu de 3.

Descifrarea codului genetic. Informația genetică purtată de molecula de ADN este „tradusă" la nivelul ribozomilor în secvențe de aminoacizi care se asamblează sub formă de structuri complexe specifice în cursul procesului de

biosinteză a proteinelor. Acest proces se realizează în mai multe etape, dintre care cea dintîi este *transcrierea* mesajului genetic al ADN într-o moleculă complementară de ARN, aşa-numitul *ARN mesager* sau de mesaj (ARN_m), care transportă informaţia transcrisă la ribosomi. În procesul de transcriere a informaţiei genetice, literele de cod *A, T, C, G* ale ADN sînt transpuse în molecula de ARN_m în literele caracteristice acestuia — *U, A, C, G*. Sub această formă, informaţia codificată ajunge la ribosomi, unde este „tradusă" în limbajul de 20 de litere al aminoacizilor.

Descrierea codului genetic ar fi fost simplificată dacă tehnic ar fi fost posibil să se determine secvenţa aminoacizilor dintr-o proteină şi secvenţa bazelor din fragmentul de ADN care o codifică. Întrucît însă pe cale analitică este extrem de greu să se stabilească secvenţa bazelor, se recurge pentru aceasta la metode indirecte, în special la sinteza de proteine sub controlul unor „mesaje" cunoscute. Două fapte experimentale au permis acest mod de abordare a problemei:

1) Izolarea polinucleotid-fosforilazei de la *Azotobacter vinelandii*, enzimă care dirijează sinteza unor polinucleotide cu compoziţie cunoscută şi cu greutate moleculară ridicată (Grünberg-Manago).

2) Încorporarea *in vitro* a aminoacizilor în proteine realizată în sisteme acelulare de *E. coli* prin intermediul unui ARN_m sintetic. Bazaţi pe aceste achiziţii, Nirenberg şi Mathaei, în 1961, au preparat un polinucleotid foarte simplu constînd dintr-un polimer de uracil. Acest polinucleotid sintetic, denumit acidul poliuridilic sau *„poli-U"*, a fost utilizat ca ARN_m pentru a se demonstra capacitatea ARN denumit „mesager" de a dirija legarea aminoacizilor în lanţuri polipeptidice.

S-a utilizat un extract acelular de *E. coli* conţinînd tot aparatul structural şi biochimic necesar pentru sinteza proteinelor (ribosomi, enzime, ATP ca sursă de energie, aminoacizi, Mg^{++} etc.) dar din care se suprimase informaţia genetică naturală prin incubarea prealabilă a amestecului, procedeu care asigură degradarea ARN_m natural dotat, la bacterii, cu o „viaţă" foarte scurtă. Experienţa a fost repetată de 20 de ori, folosindu-se acelaşi mesager sintetic „poli-U", dar de fiecare dată alt aminoacid marcat radio-

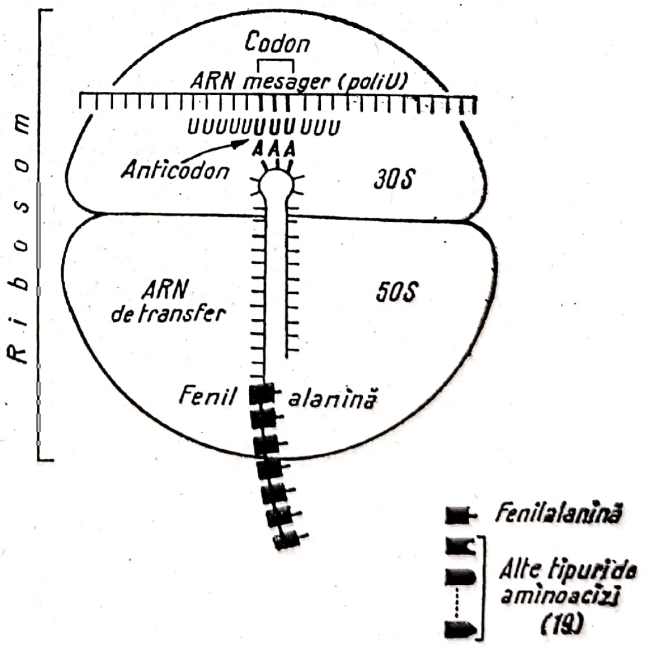


Fig. 293. Reprezentarea diagramatică a experienţelor lui Niremberg şi Mathaei. Într-un sistem conţinînd ribosomi purificaţi, ARN_t şi enzime extrase din *E. coli*, toţi aminoacizii naturali şi un polinucleotid sintetic ca acidul poliuridilic (*poli-U*) polipeptidice numai fenilalanina care este codificată de codonul „*UUU*".

activ. La sfîrşitul fiecărei experienţe se precipitau proteinele formate şi se determina radioactivitatea lor.

Rezultatele experienţelor au arătat că singurul preparat care conţinea proteină radioactivă era acela în care aminoacidul marcat introdus în sistem fusese *fenil-alanina*. Polipeptidul format sub controlul mesagerului sintetic „*poli-U*" era deci format dintr-un număr mare de molecule de fenil-alanină. Astfel s-a putut deduce că tripeta „*UUU*" reprezintă codonul corespunzător fenilalaninei. Repetarea experienţelor de acest fel, folosindu-se mesageri sintetici diferiţi sub raportul compoziţiei lor în baze, a condus la identificarea codonilor specifici pentru diverşi aminoacizi. Spre exemplu, ARN_m sintetic alcătuit numai din citozină poartă, codificată în tripleta „*CCC*", informaţia necesară pentru polimerizarea prolinei. Pe această cale s-a ajuns la stabilirea „dicţionarului" codului genetic, dicţionar alcătuit de obicei prin folosirea literelor corespunzînd bazelor din structura ARN_m.

Cercetările efectuate cu mesageri sintetici au permis astfel stabilirea *compoziţiei în baze* a celor mai mulţi codoni, dar rămînea neclarificată problema *ordinii de succesiune a bazelor* în triplete. De exemplu, în cazul tripletei alcătuită din bazele *C, C şi G*, care codifică alanina, nu se cunoştea ordinea acestora, care putea fi *CCG, CGC, GCC*, după cum în tripleta corespunzătoare acidului aspartic, constituită din literele *A, C* şi *A*, secvenţele teoretic posibile erau *ACA, AAC, CAA*. Stabilirea secvenţei bazelor în interiorul unui codon s-a realizat prin utilizarea „testului de legare" *(binding test)* imaginat de Nirenberg şi Leder.

Aceşti cercetători au sintetizat trinucleotide chimic definite — deci formate din triplete conţinînd un mesaj de 3 litere dispuse într-o succesiune cunoscută — şi au cercetat capacitatea lor de a lega de ribosomi aminoacizi marcaţi cu C^{14}. Aminoacizii se găseau în amestec sub formă de complex cu un ARN solubil (ARN_s), capabil să „recunoască" tripleta de cod corespunzătoare. Amestecul de trinucleotid, ribosomi şi C^{14}-aminoacid-ARN_s era trecut printr-un filtru de nitroceluloză care reţinea ribosomii şi lăsa să treacă toate molelulele de aminoacid-ARN_s, cu excepţia celor care s-au legat specific de ribosomi prin intermediul tripletei sintetice de ARN_m. Folosindu-se amestecuri de aminoacizi, dintre care unul singur era radioactiv, se determina cu precizie capacitatea fiecărei triplete nucleotidice de ARN_m de a „lega" de ribosomi aminoacidul marcat corespunzător, măsurîndu-se radioactivitatea filtrului care reţinuse ribosomii.

S-a demonstrat astfel că tripleta *GUU* codifică valina, *UGU* leagă de ribozomi cisteina, iar *UUG* corespunde leucinei. Prin aceeaşi metodă, o dată sintetizate toate cele 64 de triplete posibile, s-au stabilit posibilităţile de codificare ale celor mai multe dintre ele. Rezultatele obţinute au fost confirmate de studiile relative la efectul mutaţiilor asupra secvenţei aminoacizilor în diferite proteine (proteina VMT, proteina D din structura triptofansintetazei de la *E. coli* etc.).

Cîteva caracteristici generale ale codului genetic: *Codul genetic este citit secvenţial.* Pornind de la un anumit punct de plecare şi continuînd fără întrerupere şi fără vreo punctuaţie specială, citirea codului genetic se face în ace-

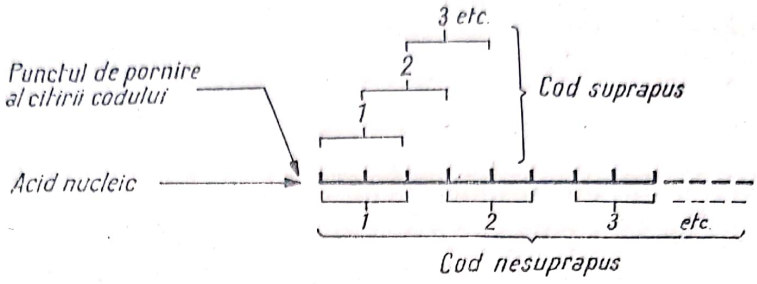


Fig. 294. Reprezentare schematică a deosebirilor dintre codul genetic suprapus şi codul nesuprapus.

laşi sens, pe grupuri de litere de mărime constantă corespunzătoare tripletelor sau codonilor, succesiv înscrise de-a lungul moleculei de ADN (Crick şi Benzer). Rezultatele experienţelor care au servit la demonstrarea caracterului triplet al codului genetic şi ansamblul datelor obţinute de Crick arată modul în care se face citirea mesajului genetic şi permit să se deducă efectul diferitelor mutaţii în ceea ce priveşte alterarea şi restaurarea mesajului normal.

Acordul nu este însă unanim asupra unora dintre problemele pe care le ridică explicarea în detaliu a modului în care decurge procesul de citire a codului genetic. Pornind de la faptul că orice mesaj este citit într-o anumită direcţie [1] şi pe un parcurs delimitat de un punct de plecare şi de unul de oprire, Tatum (1966) admite ca probabilă existenţa unor „semne de punctuaţie genetică". Astfel, semnalul care iniţiază sinteza majorităţii proteinelor la *E. coli* pare să fie o secvenţă nucleotidică particulară, specifică N-formil-metioninei şi poate chiar N-formil-metionil-alanil-serinei (Webster, Engelhardt şi Zinder). Ar fi, de asemenea, plauzibilă, după Brenner, existenţa unor semne de oprire: tripletele *UAG* şi *UAA*, care par a nu corespunde nici unui aminoacid, ar constitui două asemenea semne de punctuaţie care ar semnifica sfîrşitul lanţului polipeptidic la diferite tulpini de *E. coli*.

Codul genetic este „nesuprapus". Pe baza a diferite considerente de ordin fizico-chimic, Gamow a presupus că în structura codului genetic ar fi posibilă suprapunerea unor codoni, astfel încît o bază dată să intre în componenţa mai multor codoni adiacenţi. Aceasta ar însemna, de exemplu, că în cazul secvenţei *TAC TAC TAC TAC TAC TAC*, schimbarea prin mutaţie a unei baze, cum ar fi *C* din prima tripletă, ar modifica nu un codon, ci trei, ceea ce ar determina deci codificarea modificată a trei aminoacizi. Dar analiza mutaţiilor induse prin acid nitros la VMT a arătat că alterarea unei singure baze a acidului nucleic (ARN) al acestui virus nu determină decît schimbarea unui singur aminoacid în proteina sintetizată sub controlul genei mutante.

Codul genetic este prin urmare „nesuprapus", în sensul că un grup de trei nucleotide adiacente alcătuind un codon determină sinteza unui singur aminoacid, componentele acestui grup de baze nefiind implicate în nici un fel în semnificaţia de cod a tripletelor precedente sau următoare.

[1] Sensul în care se face citirea este în egală măsură esenţial pentru orice text, pentru că el nu este acelaşi, indiferent de limba în care este redactat textul. Există limbi în care citirea se face de la „sfîrşitul" cărţii spre „începutul" ei; rîndurile pot fi dispuse pe pagină orizontal sau vertical, iar ordinea citirii poate fi de la dreapta spre stînga sau invers.

Codul genetic este „degenerat". Întrucît aminoacizii naturali care intră în structura proteinelor nu sînt decît în număr de 20, ar fi de aşteptat ca dintre cele 64 de triplete posibile care alcătuiesc codul genetic, numai 20 să aibă un rol în codificarea biosintezei proteinelor. S-a demonstrat însă că aproape toate cele 64 triplete codifică aminoacizi, de unde rezultă că unii aminoacizi pot fi codificaţi de mai mult de un codon. Spre exemplu, *treonina* poate fi codificată de tripletele *ACA*, *ACG*, *ACC* şi *ACU*, fenilalanina de tripletele *UUU* şi *UUC*, iar *serina* de codonii *UCU* şi *UCC*. Codul genetic ar fi deci un cod degenerat. Se observă de asemenea că, în general, într-un astfel de cod degenerat codonii diferiţi corespunzători unui aceluiaşi aminoacid au unele nucleotide comune.

Natura şi gradul de degenerare a codului genetic nu sînt încă lămurite. Unii autori admit că este vorba de un grad înalt de degenerare, în sensul că aproape toate cele 64 de triplete posibile sînt implicate în codificarea celor 20 de aminoacizi naturali, în timp ce alţii consideră că degenerarea nu este completă, ci numai parţială şi chiar foarte limitată, mai ales *in vitro:* numai aproximativ 30 de triplete ar participa la codificarea aminoacizilor, restul avînd alte semnificaţii biologice.

S-a observat, în afară de codonii *cu sens*, cu semnificaţie („sense"), care codifică sinteza proteinelor în celulele tulpinilor sălbatice, normale, mai există cîteva categorii de codoni, prezenţi în genomul celulelor mutante, şi anume codonii *fără sens*, codonii cu *sens fals* şi codonii *ambigui*.

Codonii „fără sens" („non sense"), care nu au nici o semnificaţie de cod, cum ar fi *UAA* şi *UAG*, sînt consecinţa unor mutaţii denumite de asemenea „non sense". O dată transcrişi în molecula de ARN_m, ei stopează citirea mesajului genetic la nivelul ribozomilor, ceea ce determină întreruperea asamblării lanţului polipeptidic. Cînd sînt situaţi în mijlocul mesajului genetic, ei produc liberarea de pe ribosomi a unor polipeptide incomplete. Este însă posibil ca unii dintre codonii consideraţi prin definiţie drept codoni „non sense" să aibă în realitate un anumit rol biologic.

Codonii „cu sens fals" („missense") derivă tot printr-o mutaţie — de tip „false sense" — din codonii cu sens. Ei codifică încorporarea într-un anumit punct al lanţului polipeptidic a unui aminoacid diferit decît cel specificat de codonul cu sens din genomul normal. Ca urmare, se sintetizează o proteină a cărei moleculă este alterată într-un singur loc, ceea ce face ca activitatea ei biologică să fie în parte conservată.

Codonii „ambigui" au proprietatea de a specifica mai mult de un aminoacid. Existenţa lor a fost probată chiar de rezultatele experienţei lui Matthaei, pe sisteme acelulare de *E. coli*, experienţe care au arătat că, pe lîngă polimerizarea cu randament ridicat a fenilalaninei, tripleta *„poli-U"* mai specifică şi încorporarea de leucină, dar cu un randament mult mai mic. Dacă însă fenilalanina lipseşte din sistemul acelular de sinteză, atunci încorporarea leucinei creşte pînă atinge 50% din randamentul de încorporare a fenilalaninei.

Codul genetic este universal. Potrivit unor numeroase date experimentale, codul genetic este universal sau cel puţin în mare măsură universal, în sensul

A doua literă

Prima literă	U	C	A	G	A treia literă
U	UUU, UUC } Phe UUA, UUG } Leu	UCU, UCC, UCA, UCG } Ser	UAU, UAC } Tyr UAA OCHRE UAG AMBER	UGU, UGC } Cys UGA term UGG Tryp	U C A G
C	CUU, CUC, CUA, CUG } Leu	CCU, CCC, CCA, CCG } Pro	CAU, CAG } His CAA, CAG } GluN	CGU, CGC, CGA, CGC } Arg	U C A G
A	AUU, AUC, AUA } Ileu AUG Met	ACU, ACC, ACA, ACG } Thr	AAU, AAC } Asp N AAA, AAG } Lys	AGU, AGC } Ser AGA, AGG } Arg	U C A G
G	GUU, GUC, GUA, GUG } Val	GCU, GCC, GCA, GCG } Ala	GAU, GAC } Asp GAA, GAG } Glu	GGU, GGC, GGA, GGG } Gly	U C A G

Abreviaţia	Semnificaţia
A	Adenină
T	Timină
G	Guanină
C	Citozină
U	Uracil
Ala	Alanină
Arg	Arginină
AspN	Asparagină
Asp	Acid aspartic
Cys	Cisteină
Glu	Acid glutamic
GluN	Glutamină
Gly	Glicocol
His	Histidină
Ileu	Isoleucină
Leu	Leucină
Lys	Lizină
Met	Metionină
Phe	Fenilalanină
Pro	Prolină
Ser	Serină
Thr	Treonină
Tryp	Triptofan
Tyr	Tirozină
Val	Valină

Fig. 295. Dicţionarul codului genetic bazat pe corespondenţele dintre ARN*m* şi aminoacizii corespunzători (*stînga*). În *dreapta*, abreviaţiile utilizate internaţional pentru desemnarea bazelor nucleice şi a aminoacizilor. Din analiza codului reiese în mod evident importanţa primelor două litere din fiecare tripletă. Termenii *OCHRE* şi *AMBER*, referitori originar la anumite mutante bacteriene, desemnează triplete care pot acţiona ca semnale „stop" în formarea lanţurilor polipeptidice.

că aceleaşi unităţi de codificare specifică aceiaşi aminoacizi la toate organismele. În sprijinul acestei concluzii teoretice vine mai întîi faptul că la toate organismele se găsesc aceleaşi baze în componenţa acizilor nucleici şi aceiaşi aminoacizi în constituţia proteinelor. În al doilea rînd, compararea căilor de sinteză şi de degradare a constituenţilor materiei vii la diferite grupe de organisme arată că procesele esenţiale ale metabolismului sînt similare la toate organismele studiate pînă acum, deoarece sînt realizate prin aceleaşi reacţii, catalizate de enzime foarte apropiate din punct de vedere funcţional.

Spre exemplu, pe calea Embden-Meyerhof-Parnas de degradare a glucozei etapele enzimatice principale sînt similare la levuri, plante superioare şi animale. Apoi, enzimele izolate de la diferite organisme, deşi se deosebesc în oarecare măsură din punctul de vedere al structurii lor chimice, au proprietăţi catalitice comune, sînt foarte asemănătoare sub raportul compoziţiei lor în aminoacizi şi prezintă omologii importante în ceea ce priveşte succesiunea acestora în lanţul polipeptidic, secvenţe întregi ale acestuia fiind uneori identice la enzime provenite de la organisme foarte diferite. În sfîrşit, stu-

diile asupra biosintezei proteinelor *in vitro* pledează în acelaşi sens, pentru că un anumit codon are aceeaşi semnificaţie pentru toate organismele: mesagerii sintetici de tip „poli-*U*" determină încorporarea în polipeptide a fenilalaninei, tripleta „poli-*C*" codifică polimerizarea prolinei, iar codonul „poli-*A*" specifică asamblarea unui polipeptid de lizină, indiferent de sursa extractului acelular — de la bacterii pînă la mamifere superioare — în care se face experienţa.

Toate aceste date converg pentru a demonstra existenţa unui cod genetic comun tuturor organismelor, fără a exclude însă posibilitatea ca această universalitate să nu fie absolută, în sensul că în anumite privinţe codul genetic ar putea diferi de la o specie la alta. Pe de altă parte, caracterul universal al codului la organismele actuale sugerează în acelaşi timp stabilitatea lui de-a lungul unei lungi perioade de evoluţie filogenetică.

10. BIOSINTEZA PROTEINELOR

Numeroase fapte de observaţie au demonstrat fără echivoc că toate structurile, proprietăţile şi activităţile care caracterizează o celulă trebuie raportate la structura şi activitatea proteinelor, ceea ce constituie o problemă fundamentală a biologiei celulare.

Cercetările de microbiologie au adus o contribuţie de importanţă excepţională pentru cunoaşterea acestor procese comune tuturor celulelor. Lucrările lui Crick şi Watson au făcut posibilă elaborarea unei teorii generale a codului genetic, conform căreia structura proteinelor — agenţi universali ai activităţii biologice, fie ea biochimică, fiziologică sau morfogenetică — este legată de aceea a acizilor nucleici, agenţi universali al conservării, exprimării şi transmiterii potenţialului ereditar, iar structura fiecărei proteine în parte este riguros definită de o porţiune determinată a materialului genetic al celulei.

Proteinele sînt polimeri, sub formă de lanţuri polipeptidice lungi, rezultaţi din asamblarea într-o secvenţă specifică a unui număr variabil de monomeri reprezentînd molecule de aminoacizi. S-a calculat că legînd în mod diferit cei 20 de aminoacizi naturali în lanţuri polipeptidice de cîte 1 000 de unităţi s-ar obţine 10^{1278} tipuri proteine dotate cu proprietăţi biologice diferite. În afară de rolul lor structural, acela de a alcătui principala componentă a materiei vii, marea majoritate a proteinelor acţionează ca enzime sau catalizatori biologici care dirijează numeroasele reacţii chimice desfăşurate simultan în celulă.

Biosinteza proteinelor implică transmiterea informaţiei genetice de la molecula de acid nucleic, unde este codificată, la „dispozitivul" celular producător de proteine — *ribosomii* — în aşa fel încît secvenţa nucleotidelor să se traducă printr-o anumită secvenţă a aminoacizilor în lanţul polipeptidic care constituie structura de bază a proteinei. Asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică determinată constituie una dintre principalele funcţii ale materialului genetic.

Mecanismul biosintezei proteinelor a fost „descifrat" prin cercetările pe sisteme acelulare de *E. coli*. Extractele bacteriene folosite conţineau un mesager

sintetic, un amestec de aminoacizi naturali — dintre care unul era marcat radioactiv — ribosomi, enzime, o sursă de energie reprezentată de ATP, un sistem capabil să regenereze ATP, constînd din creatin-fosfat, creatin-fosfokinază şi guanozin-trifosfat, precum şi Mg^{++} şi K^{+}. După o oră de incubare la 37°C, în sistem apar primele proteine radioactive.

Procesul de biosinteză se desfăşoară în două etape:

1) *Transcrierea în ARN_m a informaţiei genetice codificată în ADN*, etapă în care informaţia este transpusă într-un limbaj nou *(ACGU)*, deosebit de acela al ADN *(ACGT)* printr-o singură literă, datorită înlocuirii timinei cu uracilul în molecula ARN; se formează acum un tip de ARN denumit de Spiegelman *„translatable ARN"*, adică *ARN „traductibil"*, sau *„messenger RNA"* — *ARN „mesager"* (mai corect *ARN „de mesaj"*, deoarece nu mesagerul este tradus, ci mesajul), notat prin prescurtare ARN_m, al cărui rol biologic este acela de a transporta la ribosomi programul de sinteză a proteinelor.

2) *Traducerea la nivelul ribosomilor a informaţiei genetice purtate de ARN_m*, etapă în care informaţia care a fost transpusă în limbajul de 4 litere al ARN_m este acum „tradusă" sau convertită în limbajul de 20 de litere corespunzătoare aminoacizilor care intră în alcătuirea proteinelor; ca „dicţionar" pentru această traducere funcţionează o colecţie de molecule de ARN *solubil*, aşa-numitul *ARN „de transfer"* (*ARN_t*), molecule capabile să „recunoască" specific atît un anumit aminoacid, cît şi codonul corespunzător din molecula de ARN_m. Datorită unor particularităţi structurale, ARN_t poate să dispună aminoacizii în locuri specifice de-a lungul moleculei de ARN_m, ceea ce asigură „citirea" şi „traducerea" mesajului genetic în secvenţe polipeptidice.

a. Transcrierea informaţiei genetice

Pentru exprimarea fenotipică a genotipului este necesar în primul rînd ca secvenţele dezoxiribonucleice, deţinătoare permanente ale informaţiei genetice, să fie transcrise în secvenţe ribonucleice apte de a fi, la rîndul lor, „traduse" în proteine. În acest proces se formează trei tipuri de ARN care participă, cu funcţii diferite, la biosinteza proteinelor:

1) *ARN de mesaj* (ARN_m), sub forma a cîteva sute sau mii de molecule cu dimensiuni variabile, acţionînd ca *matriţă* pentru polimerizarea ordonată a aminoacizilor în polipeptide specifice.

2) *ARN ribosomal* (*ARN_r*) de două tipuri (16*S* şi 23*S*), în funcţie de mărimea moleculelor (aproximativ 1 500 şi 3 000 de nucleotide), făcînd parte integrantă din structura ribosomilor.

3) *ARN de transfer sau solubil* (ARN_t sau ARN_s), molecule de cîteva zeci de tipuri compuse din circa 100 de nucleotide, jucînd rolul de „adaptori" ai aminoacizilor pe care-i transportă la nivelul ribosomilor.

ARN de mesaj (ARN_m). Compoziţia chimică a acestui acid nucleic monocatenar poate fi caracterizată prin aceea că succesiunea bazelor sale este com-

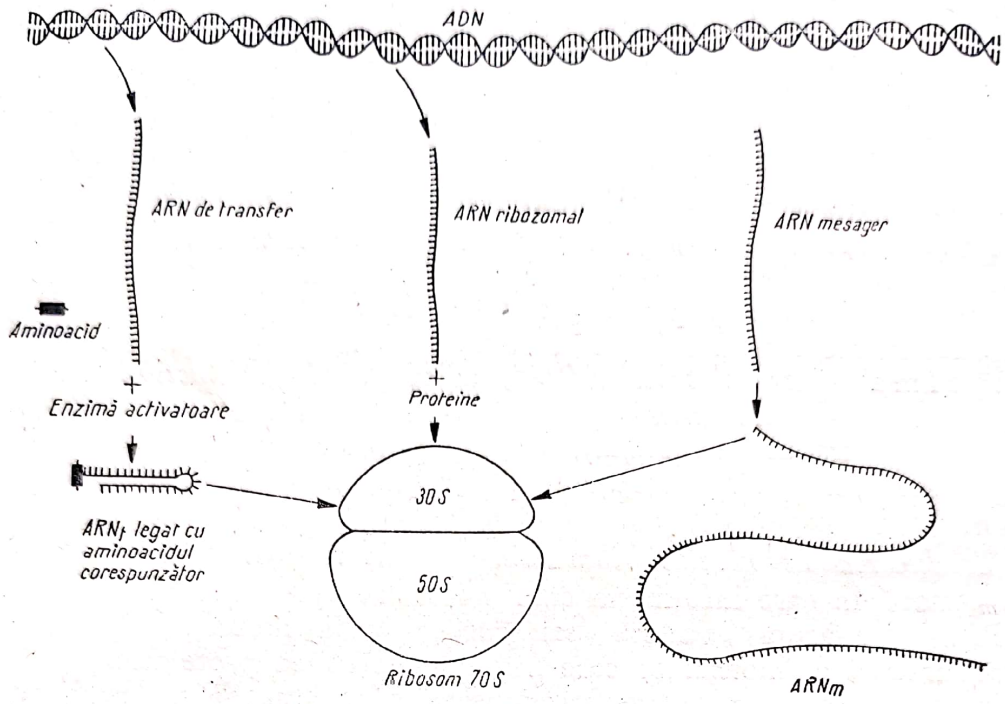


Fig. 296. Reprezentare diagramatică a etapei de transcriere a informaţiei genetice pentru biosinteza proteinelor.

plementară faţă de secvenţa nucleotidelor din fragmentul de ADN, care i-a servit ca matriţă. El este foarte eterogen ca lungime şi greutate moleculară, fapt care se reflectă în marile diferenţe de lungime dintre produşii polipeptidici elaboraţi prin intermediul diverselor molecule-matriţă de ARN_m. În medie, de exemplu la E. coli, ARN_m are 900—1 500 de nucleotide, ceea ce corespunde la o lungime de 300—500 de aminoacizi pentru un lanţ polipeptidic.

Transcrierea secvenţelor ADN în secvenţe complementare de ARN_m este efectuată sub acţiunea unei enzime — *transcriptaza* sau *ARN-polimeraza*, dependentă de ADN.

În unele cazuri, o moleculă de ARN_m este utilizată pentru biosinteza unei singure molecule de proteină. S-a constatat însă că cel mai adesea una şi aceeaşi moleculă de ARN_m, de mărime adecvată, se comportă ca un „mesager policistronic", în sensul că ea deţine informaţia necesară pentru producerea mai multor lanţuri polipeptidice. Explicaţia dată acestui fapt este aceea că, deşi diferite ca structură, asemenea polipeptide sînt înrudite funcţional şi, ca atare, sînt controlate de un operon unic, adică de o unitate integrală de expresie genetică, al cărei caracter complex, policistronic, îi permite să determine sinteza şi să regleze activitatea mai multor enzime implicate în aceeaşi cale metabolică (Spiegelman, 1963). Datele experimentale relative la mărimea moleculară şi comportarea funcţională a ARN_m au confirmat această interpretare: moleculele de ARN_m se formează în mod obişnuit prin copierea integrală a unui operon, fiind de aceea purtătoarele unui mesaj poligenic sau policistronic, şi mai rar prin copierea fiecărei gene de către o moleculă spe-

cială de ARN_m. Un exemplu de moleculă de ARN_m purtătoare a unui mesaj policistronic îl constituie ARN_m care codifică sinteza celor 10 enzime specifice, implicate în biosinteza histidinei: cu o greutate moleculară de 4 milioane, el este alcătuit din 12 000 de nucleotide, ceea ce reprezintă în medie cîte o secvenţă-matriţă de 1 200 de nucleotide pentru fiecare enzimă.

Considerată ipotetic ca absolut necesară de către Jacob şi Monod (1960), existenţa ARN_m a fost probată de-abia ulterior pe cale experimentală. Studiul efectului infecţiei cu fagi T_2 şi T_4 asupra metabolismului *E. coli* a arătat că, sub controlul ADN fagic, bacteriile infectate sintetizează o serie de constituenţi virali de natură proteică. Aceasta implică sinteza uneia sau a mai multor enzime capabile să catalizeze biosinteza şi utilizarea unor asemenea constituenţi noi. La rîndul său, sinteza acestor enzime implică participarea ribosomilor celulari şi a unor molecule specifice de ARN_m. Cum virusul injectează în celula bacteriană numai genomul său, apare ca logică ipoteza că la sinteza enzimelor de către celula-gazdă ADN fagic ar participa în mod indirect, determinînd formarea în celula bacteriană a unui ARN_m care să asigure legătura dintre ADN fagic, purtător al informaţiei genetice, şi ribosomii bacterieni la nivelul cărora se realizează sintezele codificate de genomul fagic. Într-adevăr, Volkin şi Astrachan au demonstrat că, la puţin timp după „injectarea" materialului genetic infectant, în celula bacteriană se sintetizează un ARN de tip nou, cu compoziţie corespunzătoare matriţei de ADN fagic, sub controlul căruia celula-gazdă sintetizează proteina specifică fagului. Generalitatea acestui fenomen a fost dovedită de Gros prin izolarea din bacteria infectată de fag a unui ARN_m diferit de moleculele ARN din bacteria normală.

Biosinteza ARN_m. Pe matriţa reprezentată de o catenă a dublei elice de ADN se formează o copie complementară, „negativă", de ARN. Reacţia este catalizată de ARN-polimerază (ARN-nucleotidiltransferază) şi necesită prezenţa ADN ca matriţă, a celor patru trifosfat-ribonucleotide ca precursori şi a ionilor Mg^{++}. Biosinteza se face printr-un proces secvenţial de replicare iniţiat numai în anumite puncte ale catenei de ADN. Spre deosebire de replicarea „autocatalitică" a ADN, în care sînt obligatoriu antrenate ambele catene ale moleculei, în sinteza „heterocatalitică" a ARN numai o singură catenă de ADN este „citită" şi „transcrisă". După ce s-a format, ARN se desprinde de matriţa sa de ADN care, prin sinteza unei catene complementare, revine la forma de moleculă dublă.

Specificitatea reacţiei de sinteză a ARN sub controlul ADN a fost demonstrată experimental de Manago-Grünberg şi Ochoa. Folosind ca matriţă de ADN un polimer sintetic format exclusiv din timină („poli-*T*"), ei au obţinut un ARN constituit numai din adenină („poli-*A*"), iar cu o matriţă de ADN compus din unităţi alternante de adenină şi timină (copolimer-*A-T*") au realizat un ARN alcătuit din unităţi, de asemenea alternante, de uracil şi adenină („copolimer-*U-A*"). Deşi în reacţie erau prezente toate bazele (*A*, *C*. *G*, *T* şi *U*), încorporarea lor s-a făcut în mod riguros specific, ceea ce demonstrează că celula dispune de un mecanism care asigură caracterul

dirijat al sintezei ARN prin aceea că secvenţa bazelor ADN determină secvenţa bazelor ARN.

Deoarece este metabolic instabil, cel puţin la bacterii, ARN_m este degradat şi resintetizat continuu. Durata lui medie de viaţă este, la *E. coli*, de circa 2 min. la 37°C, după care el este degradat pe cale enzimatică, nucleotidele eliberate fiind reutilizate pentru sinteză. Stabilitatea sa pare a fi mai mare atunci cînd este fixat pe ribosomi.

Rolul biologic al ARN_m. Din punct de vedere molecular, ARN_m reprezintă o „transcriere" chimică a codului ADN, constituit din dezoxiribonucleotide, în termeni de ribonucleotide componente ale ARN. Format în contact cu cromozomul la bacterii, sau în nucleu la celulele eucariote, ARN_m asigură astfel transpunerea informaţiei genetice într-un mesaj care poate fi transmis în citoplasmă. Aici, datorită aptitudinii sale de a se fixa pe ribosomi, ARN_m permite „citirea" mesajului său de către acest dispozitiv celular de sinteză a proteinelor şi „traducerea" informaţiei genetice într-un lanţ polipeptidic cu o anumită secvenţă a aminoacizilor, corespunzătoare secvenţei codonilor traduşi. După ce a servit ca matriţă pentru unul pînă la maximum 15 cicluri de sinteză proteică, ARN_m este degradat de ribonuclează.

Această concepţie asupra rolului biologic al ARN_m este sprijinită de următoarele fapte descoperite pe cale experimentală: *a*) încetarea sintezei proteinelor in vitro în urma inactivării ARN_m; *b*) dependenţa directă a activităţii de sinteză a ribosomilor de legarea de ei a ARN_m; *c*) modificarea structurii proteinei prin modificarea structurii ARN_m; *d*) mărirea de circa 20 de ori a vitezei de sinteză a proteinelor prin adăugarea de ARN_m la extractele acelulare deficitare în acest tip de ARN; *e*) posibilitatea de dirijare a sintezei proteinelor cu ajutorul unor mesageri sintetici, în sensul încorporării specifice a unor anumiţi aminoacizi, conform corespondenţei în termeni de cod genetic dintre masager şi proteina sintetizată.

b. „Traducerea" informaţiei genetice

Biosinteza propriu-zisă a proteinelor este un proces complex în cursul căruia informaţia conţinută în ADN şi transmisă la ribosomi prin intermediul ARN_m este „tradusă" într-o secvenţă polipeptidică prin asamblarea aminoacizilor într-o ordine specifică, prescrisă de informaţia genetică. Acest proces se desfăşoară în patru etape succesive:

1) activarea aminoacizilor;
2) transportul aminoacizilor activaţi la ribozomi;
3) secvenţializarea sau diataxia aminoacizilor;
4) liberarea lanţurilor polipeptidice de pe ribozomi şi morfogeneza proteinelor.

1) *Activarea aminoacizilor.* Reacţia de activare a aminoacizilor, aflaţi în stare liberă sub formă de amestec în mediul celular, este etapa iniţială indispensabilă pentru legarea lor ulterioară în secvenţe polipeptidice. În afară de aminoacizi, această reacţie mai implică o enzimă activatoare specifică pentru

fiecare aminoacid (aminoacid — ARN_s — sintetaza sau enzima Hoagland sau, încă, enzima de $pH=5$), o sursă de energie (ATP) şi un acceptor specific (ARN_s).

ARN solubil sau de transfer (ARN_s sau ARN_t). ARN_t este caracterizat printr-o greutate moleculară mică (25 000—30 000), o relativă eterogenitate sub raportul mărimii sale moleculare, o constantă de sedimentare de 4*S*, o structură constituită din 70—80—100 de nucleotide şi o aparentă solubilitate în citoplasmă, caracter care ar fi însă de ordin mai curînd biologic decît fizico-chimic.

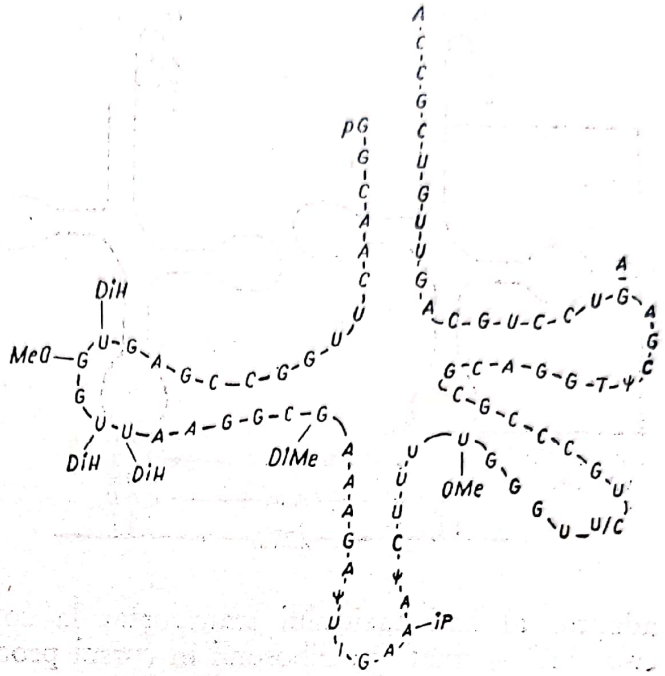


Fig. 297. Structura chimică a ARN_t al seninei.

Acest ARN are particularitatea de a fi parţial bicaternar, dar porţiunea sa dublată rezultă din îndoirea în formă de „ac de păr" a unei molecule liniare: spre mijlocul moleculei monocaternare se formează o buclă ale cărei părţi laterale, cu excepţia extremităţilor, se unesc prin punţi de H în dreptul bazelor complementare, alcătuind astfel o dublă helice asemănătoare celei de ADN. Toate moleculele de ARN_s, considerate în structura lor liniară, originară, încep cu un acid guanilic *(G)* — capătul neacceptor — şi se termină cu o secvenţă citozină-citozină-adenină *C-C-A* — capătul acceptor — care este potenţial sediul legării specifice a unui aminoacid; între aceste două extremităţi secvenţa bazelor variază de la moleculă la moleculă. În regiunea mediană a moleculei, unde se face îndoirea catenei în formă de buclă, se găsesc trei baze care rămîn neîmperechiate atunci cînd bazele complementare de pe laturile paralele ale buclei se unesc prin punţi de H. Această secvenţă de trei baze reprezintă o *„suprafaţă de recunoaştere"* care condiţionează aptitudinea de adaptare a moleculei pe o anumită matriţă nucleotidică.

O dată constituită în forma ei caracteristică parţial bicatenară, molecula de ARN_s dobîndeşte o nouă polarizare funcţională dependentă de două dintre diferenţierile ei structurale: *a) capătul acceptor* care, datorită grupului său specific de nucleotide *(C-C-A)* poate fi „recunoscut" de una dintre cele 20 de amino-acil-ARN_s-sintetaze (enzimele activatoare de aminoacizi), prin intermediul căreia de acest capăt se leagă specific un anumit aminoacid („recunoscînd" atît aminoacidul cît şi ARN_s corespunzător acestuia, enzima mediază legarea lor sub formă de complex amino-acil-ARN_s); *b) suprafaţa de recunoaştere,* tripleta de baze, denumită şi *anticodon* sau *„nodoc"* (anagrama cuvîntului „codon"), care asigură moleculei de ARN_s funcţia ei de

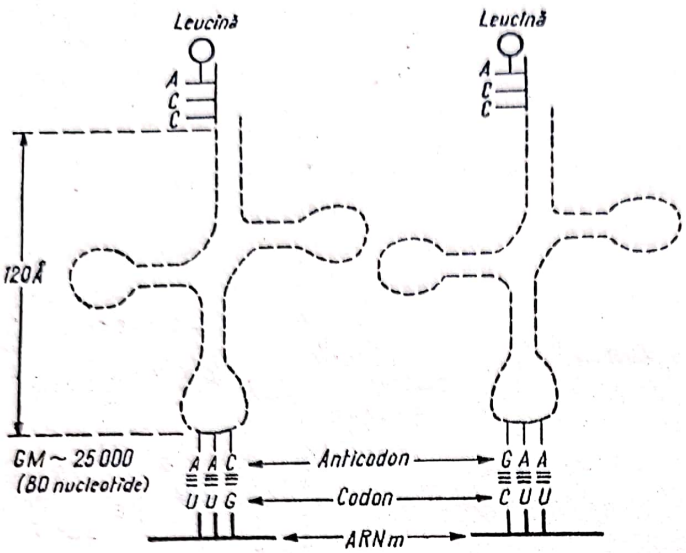


Fig. 298. Legarea specifică a ARN_t de ARN_m. Reprezentare schematică a două molecule de ARN_t capabile să lege aminoacidul leucină. Anticodonii lor „recunosc" fiecare cîte un codon diferit din molecula de ARN_m.

adaptor al aminoacidului transportat la codonul corespunzător de pe molecula ARN_m fixată pe ribosomi în cursul procesului de sinteză.

Capacitatea suprafeţei de recunoaştere a ARN_s de a identifica un anumit codon de pe ARN_m, ţine de aptitudinea de împerechere a bazelor complementare *(A-U, C-G)*, astfel încît, spre exemplu, anticodonul *UUU* al ARN_s nu se poate lega decît de codonul *AAA* al ARN_m. În acest mod, fiecare aminoacid transportat de ARN_s, sub forma complexului aminoacil-ARN_s, este „adaptat" la molecula de ARN_m adică este plasat la nivelul acelei regiuni din catena mesagerului căreia el îi corespunde în termeni de informaţie genetică şi este menţinut acolo pînă cînd este legat în lanţul polipeptidic, după care ARN_s este eliberat printr-o acţiune enzimatică. Lucrurile se petrec ca şi cum moleculele de ARN_m ar avea la suprafaţa lor, într-o ordine diferită de la moleculă la moleculă, 20 de scobituri deosebite ca formă, în care se poate angrena perfect porţiunea proeminentă de formă adecvată — suprafaţa de recunoaştere — a cîte unui ARN_s transportor de aminoacid. Specificitatea transferului de informaţie genetică şi a încorporării aminoacizilor în proteine este, prin urmare, determinată de specificitatea interacţiunii dintre ARN_m şi ARN_s. Activînd, adică legînd specific cîte un aminoacid, transportîndu-l la ribozomi şi integrîndu-l acolo într-un lanţ polipeptidic constituit conform informaţiei genetice codificată de secvenţa bazelor ARN_m, moleculele de ARN_s sau ARN_t îndeplinesc funcţia de „citire" a mesajului genetic în vederea „traducerii" lui din limbajul de 4 litere al ADN şi al ARN în acela de 20 de litere al proteinelor.

Activarea aminoacizilor se realizează printr-o reacţie care se desfăşoară în două etape cuplate, catalizate de aceeaşi enzimă, aminoacil-ARN_s-sintetaza, şi anume:

a) Sinteza unui complex intermediar enzimă-aminodacid-adenilat care determină activarea aminoacidului prin cuplarea sa cu ATP, deci prin

dobîndirea unei legături macroergice care furnizează energia necesară formării legăturii peptidice:

$$\text{Enzima} + \text{ATP} + \underset{\text{aminoacid}}{\text{HOOC}-\overset{\overset{\text{R}}{|}}{\text{CH}}-\text{NH}_2} \rightarrow \underset{\substack{\text{complex enzimă-aminoacid} \\ \text{adenilat (aminoacid activat)}}}{\text{Enzima (AMP} \sim \text{OC}-\overset{\overset{\text{R}}{|}}{\text{CH}}-\text{NH}_2)} + \underset{\substack{\text{acid} \\ \text{pirofosforic} \\ (\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7)}}{\text{PP}}$$

b) Separarea aminoacidului activat de suportul său adenilic şi cuplarea sa în mod specific cu ARN_s corespunzător:

$$\underset{\substack{\text{complex enzimă-aminoacid} \\ \text{adenilat (aminoacid activat)}}}{\text{Enzima (AMP} \sim \text{OC}-\overset{\overset{\text{R}}{|}}{\text{CH}}-\text{NH}_2)} + \text{ARN}_s \rightarrow \text{Enzima} + \underset{\text{aminoacil-ARN}_s}{\text{NH}_2-\overset{\overset{\text{R}}{|}}{\text{CH}}-\text{CO}-\text{ARN}_s} + \text{AMP}$$

La sfîrşitul reacţiei, aminoacidul este „activat" în sensul că este cuplat cu ARN_s specific corespunzător lui (prin integrare în complexul *AA — Adaptor*) şi cu energia necesară reacţiilor ulterioare, depozitată în legătura macroergică (~). Specificitatea reacţiei este asigurată de capacitatea enzimelor specifice (aminoacil-ARN_s sintetaze) de a „recunoaşte" atît un anumit aminoacid, cît şi ARN_s corespunzător. Eventualele „erori de recunoaştere" se traduc prin modificări ale succesiunii aminoacizilor în lanţul polipeptidic. Procesul de recunoaştere este asigurat de faptul că fiecăruia dintre cei 20 de aminoacizi naturali care intră în mod normal în constituţia proteinelor îi corespund atît unul sau mai multe tipuri de ARN_s, cît şi o enzimă activatoare specifică.

2) *Transportul aminoacizilor activaţi la ribosomi.* Moleculele de ARN_s cu funcţie de adaptor al aminoacizilor au o puternică afinitate chimică pentru nucleotidele ARN_m. Datorită acestei afinităţi, ele sînt transportate — împreună cu aminoacidul cu care sînt cuplate — la complexul ARN_m-ribozom pe care, la rîndul lor, se fixează.

Ribosomii. Sinteza proteinelor nu se face niciodată liber în soluţie, ci numai pe suprafaţa ribosomilor. Aceste structuri citoplasmatice funcţionează ca „dispozitive" care, cu ajutorul ARN_s, realizează „traducerea limbajului nucleic" al ARN_m în „limbajul peptidic" al proteinelor, îndeplinind pe această cale în celulă rolul unor veritabile fabrici miniaturale de proteine.

Ribosomii au suprafeţe specifice care permit legarea ARN_m, a aminoacizilor activaţi prin cuplarea cu ARN_s şi a lanţului polipeptidic în curs de formare. În procesul de biosinteză a proteinelor, funcţia lor principală este aceea de a orienta în mod adecvat molecula de ARN_m şi moleculele de aminoacizi activaţi care vin la ribosomi, pentru a asigura citirea corectă a

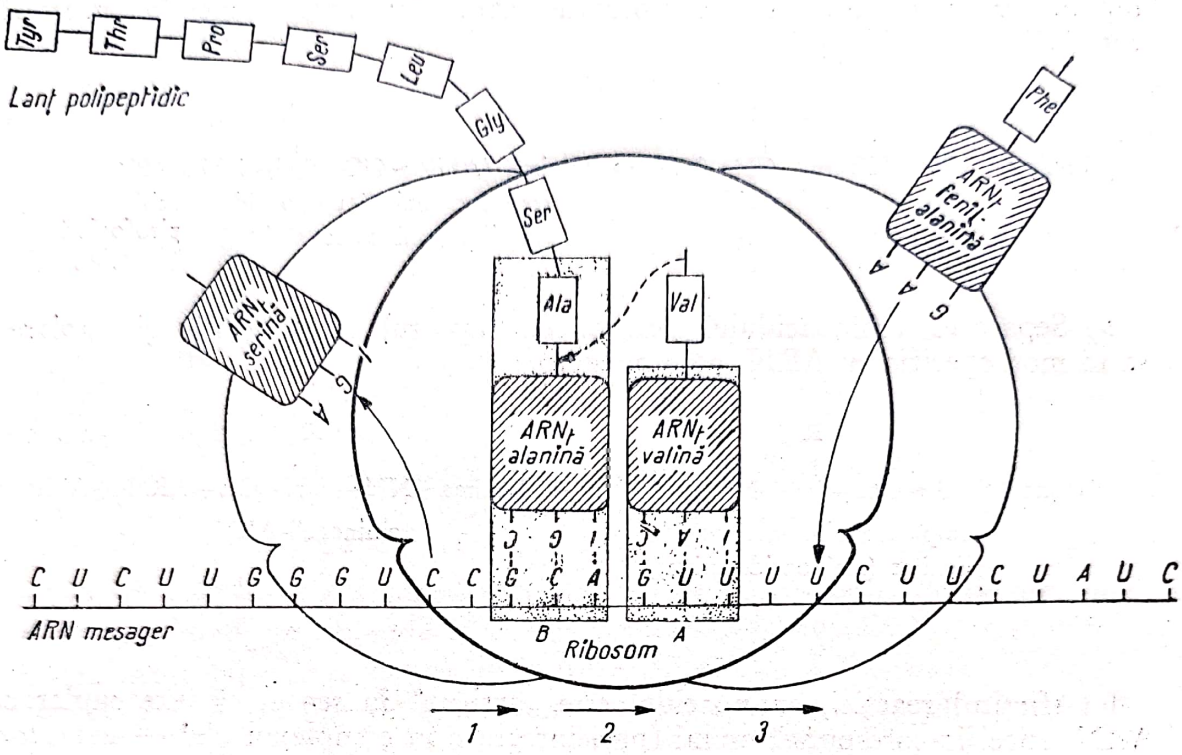


Fig. 299. Sinteza proteinelor; aminoacidul transportat de ARN_t corespunzător la ribosom este legat de anticodonul respectiv din ARN_m. Ribosomul are o suprafață *(A)* pentru fixarea moleculei ARN_t nou venită și o alta *(B)* pentru menținerea lanțului polipeptidic pe cale de formare. Ribosomul este prezentat deplasîndu-se în lungul ARN_m pentru citirea succesivă a codonilor (după Crick).

codului genetic, dispunerea în ordinea prescrisă a aminoacizilor codificați și formarea legăturilor peptidice între ei.

Din punct de vedere structural, ribosomii sînt formați din două subunități constituite din ARN și proteină, cea mai mare dintre ele avînd o mărime aproximativ dublă față de cea mai mică. Raportul ARN/proteină în compoziția ribozomilor este de 2/1 la *E. coli* și de 1/1 la alte organisme. Cea mai mare parte a proteinelor ribozomului — care sînt de aproximativ 30 de tipuri diferite — au numai un rol structural. În fracțiunea proteică a celor două subunități ale ribozomului se găsesc însă și unele molecule, cu greutate moleculară de 30 000, a căror funcție principală este aceea de a favoriza fixarea corectă pe ribosomi a ARN_m și a complexelor aminoacid-ARN_s.

Ribosomii sînt structuri genetice nespecifice, în sensul că ei pot servi ca sediu de sinteză pentru oricare dintre proteinele celulare. Această lipsă de specificitate a unor structuri implicate într-un proces de sinteză cu caracter specific se explică prin aceea că natura proteinelor sintetizate în contact cu ribosomii depinde de fapt de un singur factor, și anume de natura „programului informațional", adică a mesajului genetic adus de ARN_m la nivelul

acestei structuri care-l fixează temporar. Importanţa ribosomilor în biosinteza proteinelor poate fi lesne apreciată dacă se ţine seama de faptul că ei reprezintă aproximativ 1/4 din masa totală a celulei şi că, după ce un lanţ peptidic a fost constituit şi s-a desprins de la locul său de sinteză, ribosomii rămaşi liberi sînt imediat disponibili pentru sinteza altei proteine.

Pe suprafaţa unui ribosom sau monosom se poate forma la un moment dat numai un singur lanţ polipeptidic. Celula bacteriană dispune însă şi de o modalitate mai eficientă de sinteză a proteinelor legată de posibilitatea grupării unui număr variabil de monosomi (4—50) într-o structură dinamică — *polisom* sau *poliribosom* — permiţînd sinteza simultană a mai multor lanţuri polipeptidice sub controlul aceleiaşi molecule de ARN_m. Puşi în evidenţă la bacterii şi numai la unele dintre celulele superioare — la reticulocite — polisomii par să lipsească din celulele ai căror ribosomi sînt incluşi în reticulul citoplasmic şi, ca atare, nu se mai pot grupa.

Dimensiunile polisomilor, variabile după tipul celulei, sînt în funcţie de mărimea ARN_m deci, indirect, de mărimea proteinei care urmează a fi sintetizată. În cazul unei utilizări maxime a unui lanţ ARN_m, este nevoie de un ribosom pentru fiecare 80 de nucleotide de ARN_m, ceea ce corespunde în codul triplet la circa 27 de aminoacizi. Ca urmare, poliribosomi de 4—6 unităţi monosomice pot lega 150 de aminoacizi, în timp ce 12—20 de monosomi pot face sinteza unor polipeptide conţinînd circa 300—500 de unităţi de aminoacid. Capacitatea unei singure molecule de ARN_m de a funcţiona simultan pe mai mulţi ribosomi explică modul în care biosinteza proteinelor, atît de importantă calitativ şi cantitativ, poate fi realizată cu o cantitate relativ mică de ARN_m (aproximativ 2% din cantitatea totală de ARN). Deoarece atunci cînd acţionează la nivelul unui polisom, ARN_m funcţionează simultan pe mai mulţi ribosomi, la un moment dat mai mulţi dintre codonii săi se comportă concomitent ca matriţă, fiecare pe cîte un monosom.

ARN ribosomal (ARN_r). ARN_r reprezintă fracţiunea cu moleculă mare a ARN celular. Greutatea lui moleculară variază între $5{,}5—7{,}5 \times 10^5$ şi $1{,}1—1{,}5 \times 10^6$, corespunzător celor două grupuri de mărime moleculară

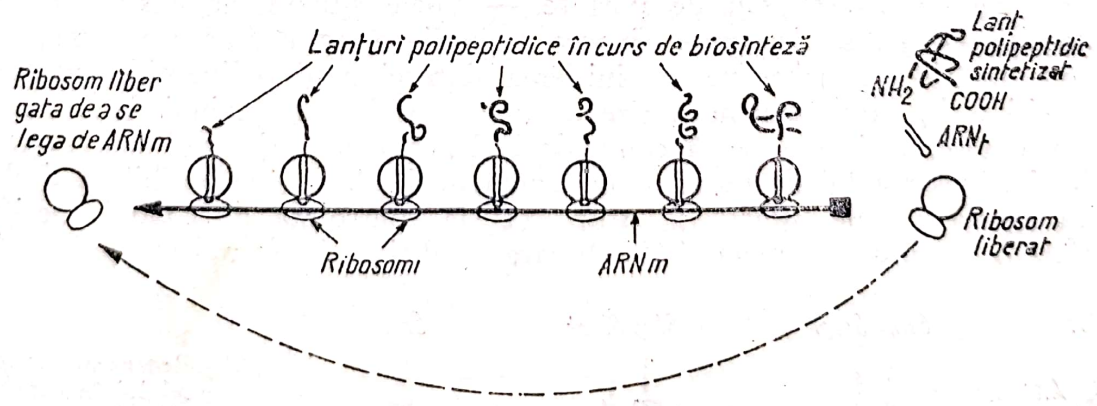


Fig. 300. Reprezentare schematică a modului de funcţionare a unui polisom în cursul procesului de biosinteză a proteinelor. Molecula de ARN_m determină iniţierea sau oprirea sintezei unui polipeptid (după Watson).

avînd constantele de sedimentare de 16*S* şi respectiv 23*S*. El conţine între 1 500 şi 4 000 de nucleotide. Molecula de ARN_r este monocatenară, dar structura sa implică şi porţiuni dublu catenare determinate de îndoiri ale catenei şi stabilirea de legături de H între bazele complementare care ajung să fie plasate faţă în faţă.

Funcţia ARN_r nu este cunoscută. Se ştie însă că el nu are rol de matriţă şi, ca atare, nu are vreun rol specific în încorporarea aminoacizilor în lanţuri polipeptidice. El ar acţiona mult mai simplu, combinîndu-se cu proteinele pentru a forma ribosomii care constituie suportul necesar acţiunii ARN_m.

3) *Secvenţializarea sau diataxia aminoacizilor. Diataxia* reprezintă etapa în care aminoacizii activaţi, cuplaţi cu ARN_s, sînt dispuşi la suprafaţa ribozomilor într-o ordine specifică potrivit informaţiei genetice codificate de ARN_m, după care urmează formarea legăturilor polipeptidice dintre ei, adică sinteza lanţului polipeptidic.

Iniţierea procesului de biosinteză a proteinelor mai implică şi fixarea prealabilă a ARN_m pe ribosomi. Acest proces, care se realizează la nivelul subunităţii mici a ribosomului, nu este posibil în orice regiune a moleculei de ARN_m natural, ci numai în unul sau mai multe „puncte de alipire", echivalente probabil secvenţelor nucleotidice care codifică primul aminoacid dintr-un lanţ polipeptidic. Hadjiolov (1967) atribuie două funcţii distincte părţilor componente ale ribosomului şi anume: *a)* subunitatea mare sau *adaptosomul* ar participa la adaptarea întregului ribosom la condiţiile de mediu ale celulei — cum este, spre exemplu, interacţiunea cu ARN_t, în timp ce *b)* subunitatea mai mică, *informosomul*, ar fi implicată în procesul de transfer al informaţiei genetice de la cromozom la citoplasmă.

Faptul că adeseori un ARN_m codifică mai multe lanţuri polipeptidice diferite arată că procesul de sinteză, care în asemenea cazuri nu este unic ci multiplu, nu începe automat de la un capăt al moleculei de ARN_m pentru a se termina la celălalt, ci că pentru fiecare lanţ polipeptidic el începe şi se sfîrşeşte succesiv în anumite puncte de-a lungul polinucleotidului de ARN_m. Aceasta implică necesitatea ca pe molecula de ARN_m să existe mai multe dispozitive de „start" sau de pornire — unele situate chiar spre mijlocul moleculei — care să determine fixarea regiunii corespunzătoare a mesagerului pe cîte un ribosom liber pentru iniţierea sintezei unui polipeptid, precum şi dispozitive de „stop" sau de oprire — plasate şi în alte regiuni decît capătul distal al moleculei — care să comande încheierea creşterii unui lanţ polipeptidic şi eliberarea lui de pe ribosom. După unele date, este posibil ca declanşarea semnalelor de „start" şi „stop" să fie controlată de codoni specifici. Astfel, o anumită tripletă *(AUG)* care codifică N-formil-metionina (un

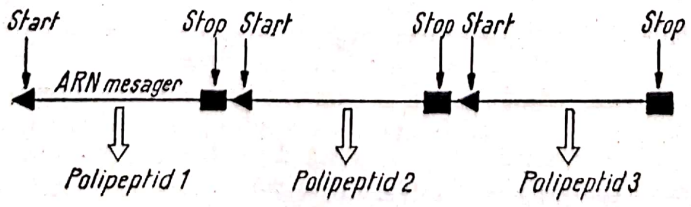


Fig. 301. Reprezentare schematică a modului în care unii codoni cu funcţie de semnal din ARN_m determină iniţierea sau oprirea sintezei unui polipeptid (după Watson).

derivat al aminoacidului metionină) s-ar fixa prima pe polisom şi ar servi de semnal pentru iniţierea biosintezei lanţului polipeptidic. Ulterior, N-formilmetionina ar fi eliminată din lanţul polipeptidic pe cale enzimatică.

După „alipirea" mesagerului de ribosom începe sinteza polipeptidului. Iniţierea lanţului peptidic se produce prin inserarea unei molecule specifice de $AA \sim ARN_s$ (aminoacid cuplat cu ARN_s prin intermediul unei legături macroergice) într-o cavitate formată prin unirea subunităţii mari (50*S*) a ribosomului cu primul codon sau cu codonul următor punctului de „start" al ARN_m), cavitate cunoscută sub denumirea de „loc de legare al $AA \sim ARN_s$". Inserarea sau legarea acestui complex se face prin suprafaţa specifică a moleculei de ARN_s — „suprafaţa sa de recunoaştere" — pe principiul cuplării codonului de pe ARN_m cu anticodonul constituit de cele trei baze ale acestei suprafeţe a ARN_s. Interacţiunea tranzitorie dintre un codon al ARN_m şi secvenţa nucleotidică complementară sau anticodonul ARN_s asigură selectarea corectă şi aşezarea specifică a aminoacizilor de-a lungul matriţei de ARN_m.

În etapa următoare a biosintezei, ARN_m se deplasează într-o direcţie determinată, aducînd astfel un nou codon în poziţia potrivită pentru a selecta precursorul adecvat. Astfel, o dată legată prima moleculă de precursor $AA \sim ARN_s$, o a doua moleculă de precursor este inserată într-o cavitate adiacentă, a cărei specificitate este determinată probabil de fixarea pe ribozom a codonului următor al ARN_m. După ataşarea complexului $AA \sim ARN_s$, adaptorul — molecula de ARN_s — se desprinde, eliberînd grupul — COOH terminal al aminoacidului, apoi se îndepărtează de ribosom. Între acest grup COOH eliberat şi grupul NH_2 al unui nou aminoacid inserat se formează pe cale enzimatică o legătură peptidică şi astfel rezultă un dipeptid care pentru moment se termină cu fracţiunea ARN_s a celui de-al doilea complex $AA \sim ARN_s$. Procesul de adiţie a cîte unui nou aminoacid se repetă în acelaşi mod pînă la formarea unui lanţ polipeptidic complet.

Fiecare adiţie de aminoacid este condiţionată şi precedată de deplasarea prealabilă a moleculei de ARN_m, care aduce în dreptul locului de sinteză mereu alt codon, corespunzător altui aminoacid. Dispozitivul de sinteză ar putea fi asemănat cu „capul de citire" al magnetofonului prin faţa căruia trece banda magnetică imprimată, care ar fi comparabilă, la rîndul ei, cu catena de ARN_m conţinînd informaţia codificată. Ca urmare a acestui mod de realizare a sintezei, fiecare subunitate ribosomică 50*S* are la nivelul său un lanţ polipeptidic în curs de formare. Asamblarea unităţilor de aminoacid în structura polipeptidică se face prin legarea grupării — COOH a unui aminoacid cu gruparea — NH_2 a celui următor, însoţită de pierderea unei molecule de apă. Aminoacizii terminali ai lanţului polipeptidic complet format îşi păstrează liberă cîte o grupare caracteristică — NH_2 şi respectiv — COOH. Se admite că sinteza începe totdeauna de la extremitatea aminată a polipeptidului şi se încheie cu cea carboxilică. Nu se cunosc pînă acum nici mecanismul care asigură deplasarea ARN_m în dreptul ribosomilor şi nici detalii asupra formării pe cale enzimatică a legăturilor peptidice.

Datorită faptului că porţiunea din molecula de ARN_m care vine în contact cu un singur ribosom este relativ mică, molecula mesagerului se poate deplasa

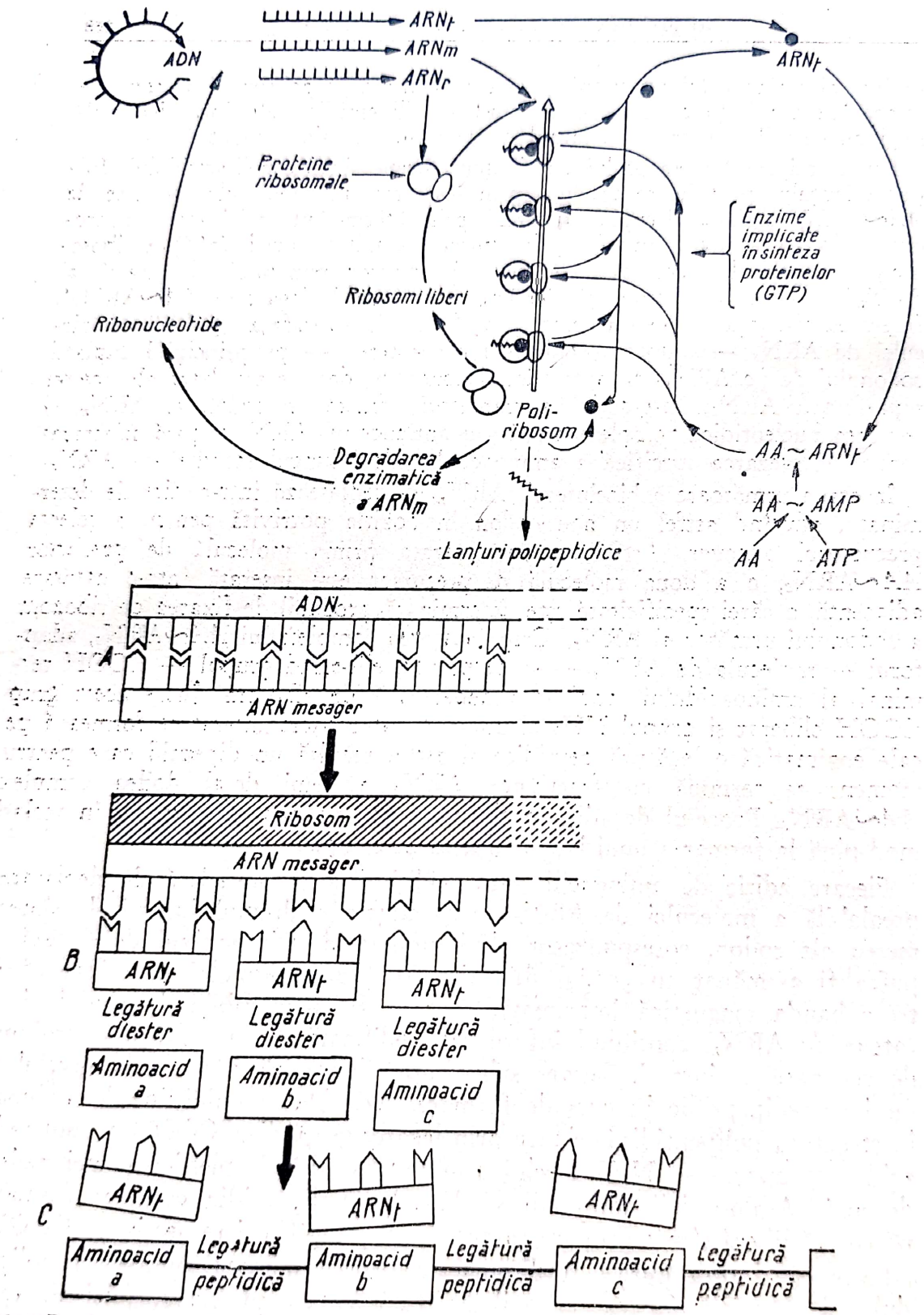


Fig. 302. Reprezentare schematică (după Watson) a rolului acizilor nucleici în biosinteza proteinelor (*sus*) (după Watson); *jos:*

A — formarea ARN_m după modelul ADN; *B* — legarea ARN_m pe ribosom și așezarea specifică a aminoacizilor (*a*, *b*, *c* etc.) legați de ARN_t; *C* — formarea legăturilor peptidice și liberarea ARN_t.

pentru a acţiona simultan la nivelul mai multor ribosomi, funcţionînd în acest caz ca matriţă pentru formarea concomitentă a mai multor lanţuri polipeptidice. Ribosomii implicaţi într-un astfel de proces de sinteză simultană alcătuiesc o unitate funcţională denumită *polisom*.

Formarea polisomilor are loc chiar în cursul şi pe măsura desfăşurării biosintezei proteice. Molecula de ARN_m iniţiază sinteza unui lanţ polipeptidic la nivelul unui monosom, deplasîndu-se la suprafaţa acestuia pe măsură ce procesul de sinteză înaintează. Cînd partea ei anterioară a depăşit acest monosom, ea se poate angaja pe un al doilea, pentru a începe sinteza unui polipeptid identic, după care trece pe un al treilea, şi aşa mai departe. Datorită acestui mecanism, lungimea lanţurilor polipeptidice fixate pe monosomii succesivi ai unui polisom variază în funcţie de fracţiunea din „banda" de ARN_m la care fiecare ribosom a fost deja expus. Aceasta înseamnă că lanţurile polipeptidice sintetizate de-a lungul unei molecule de ARN_m sînt mai scurte în porţiunea iniţială a benzii şi tot mai lungi spre extremitatea ei. Cînd molecula de ARN_m a parcurs integral un ribosom al polisomului, monosomul respectiv este eliberat şi părăseşte polisomul liberînd în acelaşi timp polipetidul format, în timp ce molecula de ARN_m se fixează pe un nou ribosom şi iniţiază sinteza unui nou lanţ polipeptidic.

4) *Liberarea lanţului polipeptidic de pe ribozomi şi morfogeneza proteinelor*. Cînd mesajul a fost „citit" şi „tradus" pe toată lungimea lui şi, ca urmare, lanţul polipeptidic a fost integral constituit, grupul carboxilic al ultimului aminoacid din lanţ se eliberează de ARN_s care i-a servit de adaptor şi astfel întregul polipeptid poate părăsi ribosomul.

Morfogeneza proteinelor. O dată formate, lanţurile polipeptidice suferă modificări de configuraţie rezultînd din stabilirea unor legături intercatenare. Structura primară sau secundară a proteinelor se datoreşte formării legăturilor intracatenare, iar structura lor terţiară sau cuaternară ţine de constituirea legăturilor intercatenare care le conferă diferite configuraţii spaţiale.

La bacterii, viteza sintezei proteinelor este foarte mare. După Watson, formarea unui lanţ polipeptidic cu greutate moleculară de 40 000 necesită aproximativ 10 secunde, iar la *E. coli* în faza de creştere exponenţială, sinteza unor molecule complete de proteină este realizată în medii sintetice chiar în 5 secunde.

Iniţierea prin inducţie a sintezei unei enzime, ca şi blocarea acestei sinteze, se pot face de asemenea foarte rapid ca răspuns la un stimul corespunzător. Spre exemplu, o bacterie care în mediu glucozat nu formează beta-galactozidază, produce această enzimă în numai 90 secunde atunci cînd este cultivată în prezenţa lactozei care acţionează ca inductor al sintezei acestei enzime. Viteza de sinteză este însă de cel puţin 100 ori mai mică în medii acelulare, de unde reiese că în procesele de biosinteză proteică, în afară de prezenţa informaţiei genetice, a mesagerilor, a precursorilor şi a unor factori de mediu adecvaţi, o mare importanţă au şi fenomenele de reglare fină care au loc în celula vie.

11. RELAŢII ÎNTRE STRUCTURA GENELOR ŞI STRUCTURA PROTEINELOR. COLINEARITATEA GENEI ŞI A PRODUSULUI SĂU PROTEIC

Informaţia ereditară, codificată conform ipotezei lui Crick sub formă de secvenţă lineară în moleculele de ADN, specifică, adică determină în mod direct secvenţa lineară a aminoacizilor în moleculele de proteină. Această relaţie sugerează existenţa unei colinearităţi, adică a unei corespondenţe lineare între fiecare codon sau unitate de codificare şi aminoacidul pe care-l specifică, respectiv între fiecare genă şi proteina specificată. Ipoteza asupra codului genetic formulată de Crick sugerează, de asemenea, că alterări localizate ale secvenţei nucleotidice a unei gene au ca efect alterări localizate corespunzătoare ale secvenţei de aminoacizi din proteina a cărei sinteză este determinată de gena respectivă.

Este deci teoretic posibil să se demonstreze relaţia de colinearitate genă-proteină, comparîndu-se localizarea mutaţiilor pe harta genetică a genei cu poziţia în lanţul polipeptidic a aminoacizilor substituiţi celor normali, în cazul fiecărei mutaţii. Conform previziunii lui Crick, o asemenea demonstraţie este posibilă din punct de vedere tehnic numai la microorganisme. Ea a fost făcută atît la *E. coli* cît şi la mutantele denumite „amber" ale fagului T_4.

Se ştie că în unele cazuri un singur lanţ polipeptidic formează o moleculă completă de proteină, activă ca enzimă sau catalizator biologic. Alteori însă, formarea unei proteine-enzimă active este rezultatul asocierii a două sau mai multe lanţuri polipeptidice. Astfel, triptofan-sintetaza de la *E. coli*, folosită de Yanofski pentru studiul colinearităţii genă-proteină, este alcătuită din două lanţuri *A* (α) şi două lanţuri *B* (β) uşor separabile şi inactive enzimatic atunci cînd sînt separate. Întrucît determinarea secvenţei bazelor dintr-o porţiune a moleculei de ADN care determină sinteza unei proteine este foarte greu de efectuat prin analiza chimică, se recurge pentru aceasta la *harta genetică* a genei respective, elaborată pe baza unor experienţe de recombinare intragenică.

Lucrînd cu *E. coli*, Yanofski a izolat un număr mare de mutante, care erau inactive enzimatic din cauză că un lanţ polipeptidic *A* din molecula triptofansintetazei nu era funcţional. Studiul acestor mutante arătase că ele rezultau din alterări survenite într-un număr mare de locuri de pe harta genetică lineară a regiunii corespunzătoare din cromozomul bacterian. Mai departe, acest cercetător a izolat lanţuri polipeptidice *A* inactive şi le-a comparat din punctul de vedere al succesiunii aminoacizilor cu lanţul polipeptidic corespunzător dar activ din molecula triptofansintetazei elaborată de tipul sălbatic. Comparaţia a arătat că localizarea unei mutaţii în lungul unei gene este corelată cu sediul înlocuirii unui aminoacid în lanţul polipeptidic a cărui sinteză este controlată de această genă. Cum ambele structuri — genă şi proteina — sînt liniare, modificările lor sînt colineare sau exact corelate, în sensul că înlocuirea unor aminoacizi în proteină se face într-o ordine care coincide întocmai cu aceea a locurilor alterate prin mutaţie în gena corespunzătoare.

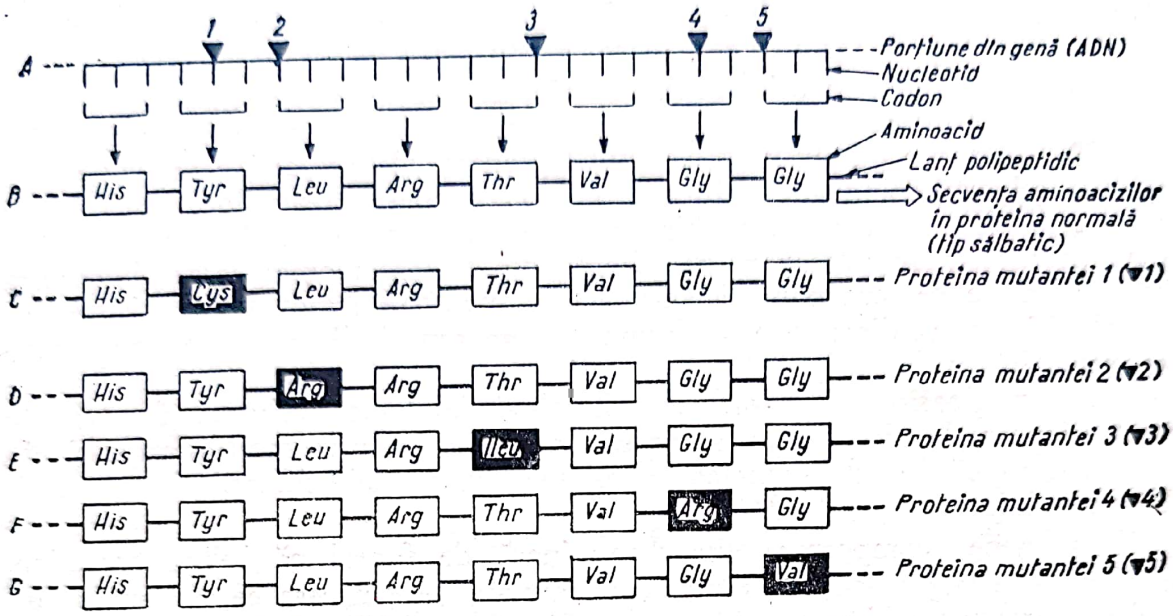


Fig. 303. Reprezentare schematică a experienţelor care au demonstrat structura colineară a genelor şi a produsului lor proteic:

A şi *B* — secvenţa bazelor în molecula normală de ADN şi respectiv secvenţa aminoacizilor în polipeptidul codificat de ea; *C*, *D*, *E*, *F* şi *G* — secvenţe polipeptidice modificate prin apariţia unor aminoacizi neobişnuiţi în poziţii care corespund acelora ale codonilor respectivi alteraţi prin mutaţie.

Experienţele lui Yanofski, care demonstrează relaţia dintre structura genelor şi aceea a proteinelor formate sub controlul lor, aduc o nouă confirmare ipotezei lui Crick asupra codului genetic bazat pe secvenţa bazelor, prin aceea că pun în lumină următoarele fapte: *a)* fiecare aminoacid din lanţul polipetidic este codificat de o anumită regiune specifică a genei; *b)* o anumită secvenţă a unităţilor de codificare (codoni) în molecula de ADN specifică în mod necesar o secvenţă corespunzătoare a unităţilor de aminoacid în molecula de proteină; *c)* substituirea prin mutaţie a unei secvenţe din molecula de ADN antrenează obligatoriu substituirea unui aminoacid din lanţul polipeptidic, şi anume într-o regiune a polipeptidului care corespunde sediului mutaţiei de pe gena determinantă.

12. ORGANIZAREA ACTIVITĂŢILOR CELULEI BACTERIENE. CONTROLUL ŞI INTEGRAREA FUNCŢIILOR CELULARE

Viaţa celulelor, ca şi a organismelor, este subordonată funcţionării coordonate a unui mare număr de sisteme enzimatice care catalizează diferitele reacţii chimice implicate în metabolismul celular. Natura, cantitatea şi activitatea acestor enzime sînt reglate în aşa fel încît să se asigure celulelor un echilibru stabil sub raportul conservării caracterelor lor specifice, dar în acelaşi timp suficient de suplu şi de dinamic pentru a le permite o adaptare continuă la condiţiile schimbătoare ale mediului. Numeroase fapte de observaţie ple-

dează în acest sens, sugerînd existenţa unor mecanisme de reglare perfectă a diferitelor procese metabolice.

Celula bacteriană, ca orice organism viu, se află în permanenţă într-o stare de echilibru dinamic în care toate componentele ei — cu excepţia posibilă a ADN — sînt continuu construite şi degradate. Ca urmare, compoziţia chimică a celulei depinde de natura şi viteza relativă a reacţiilor chimice care au loc în ea. Aceste procese chimice evoluează însă nu la întîmplare, ci în mod coordonat, în raport cu necesităţile din fiecare moment ale celulei. Aşa se explică de ce, cu toate că în reacţiile metabolice sînt implicaţi sute de metaboliţi intermediari diferiţi, numai foarte puţini dintre ei se acumulează în exces, în aşa fel încît să fie decelabili în mediul de cultură. Astfel, funcţionarea armonioasă a tuturor mecanismelor fiziologice celulare face ca în condiţii normale nici o proprietate să nu se manifeste în mod anarhic şi nici o structură să nu dobîndească o preponderenţă nejustificată de economia ansamblului.

O asemenea comportare este determinată de faptul că celula bacteriană prezintă, de la moment la moment, o mare variaţie în ceea ce priveşte numărul de proteine-enzime, ceea ce denotă o deosebită supleţă a mecanismelor metabolice care le asigură sinteza, mecanisme capabile să intre în acţiune în mod selectiv, pe măsura necesităţilor imediate ale celulei. Astfel, o celulă de *E. coli* cultivată pe medii în care glucoza reprezintă unica sursă de C conţine 2 000 de tipuri de proteine diferite, incluzînd în cantităţi mari enzimele care catalizează reacţiile de degradare a glucozei, de producere de energie, de sinteză a aminoacizilor şi a nucleotidelor, precum şi sinteza unor proteine structurale din ribozomi, peretele celular şi membrana citoplasmatică, în timp ce alte tipuri de enzime pe care celula le poate elabora nu sînt reprezentate de loc.

Schimbarea glucozei ca aliment carbonat printr-o altă substanţă cu acelaşi rol determină o modificare corespunzătoare a materialului enzimatic sintetizat. Aceasta demonstrează că, deşi celula posedă întreaga informaţie genetică, asigurînd potenţialul ei specific de biosinteză, ea nu exprimă fenotipic decît cîte o parte a acestui potenţial în funcţie de condiţiile mediului şi de starea ei fiziologică. Genele nu funcţionează deci toate simultan şi continuu pentru a determina concomitent sinteza tuturor proteinelor codificate în structura lor, deoarece aceasta ar duce la perturbări foarte grave ale metabolismului celular, antrenînd alterarea echilibrului intern al celulei.

Selectivitatea exprimării fenotipice a potenţialităţilor genotipice de sinteză implică existenţa unor mecanisme de reglare fină, care să declanşeze sau să blocheze sinteza anumitor tipuri de proteine. Importanţa capacităţii de reglare a naturii şi nivelului biosintezei proteice este uşor de apreciat dacă se ţine seama de faptul că cele mai multe proteine celulare au funcţii enzimatice implicate în metabolismul energetic, în sinteza tuturor constituenţilor celulari, inclusiv a celor macromoleculari (glucide, lipide, proteine), precum şi în replicarea materialului genetic. Aceasta face ca sinteza enzimelor să reprezinte o treaptă esenţială în metabolismul celular, întrucît de ea depind toate celelalte proprietăţi ale celulei. Toate sintezele celulare sînt deci reglate, după

cum este deja evident, graţie controlului intern exercitat de materialul genetic şi în funcţie de semnalele de ordin fizico-chimic ale mediului extern.

Pentru înţelegerea modului de desfăşurare a proceselor de reglare, se poate recurge la o analogie între celula bacteriană şi o uzină, avînd în vedere asemănările funcţionale care se pot identifica la toate nivelele de analiză. Fireşte, o asemenea analogie este justificată exclusiv din punct de vedere didactic şi numai dacă se ţine seama în permanenţă de deosebirile fundamentale dintre o uzină şi un organism viu.

Bacteriile sînt „uzine" de produse chimice cu un potenţial de producţie excepţional, dar deosebite de uzinele veritabile, între altele, prin capacitatea lor de adaptare la mediu şi prin facultatea de reproducere. Alcătuite din structuri interdependente, ele sînt sediul unor reacţii chimice complexe, catalizate de enzime proteice specifice, care sînt sintetizate în celulă şi care ar juca rolul unor adevărate „maşini biologice". Celula bacteriană ar putea fi de asemenea comparată cu o uzină în care se produc diferite tipuri de blocuri de construcţie, în proporţii şi în cantităţi precis determinate, întrucît orice producţie depăşind necesităţile prescrise înseamnă risipă şi, ca atare, scăderea potenţialului de activitate productivă sau, în termeni de biologie, a potenţialului de luptă pentru existenţă.

Întocmai ca o uzină automatizată, în care diferitele instalaţii lucrează coordonat, la unison, răspunzînd cantitativ şi calitativ la comenzile programului iniţial de lucru dar şi la semnale emise pe parcursul procesului de producţie, celula dispune de un sistem de autoreglare echivalent unui dispozitiv de control automat, care-i asigură cea mai economică utilizare a energiei disponibile. Într-o asemenea „uzină" înzestrată cu dispozitive de autoreglare, „maşinile" sau dispozitivele de producţie ar fi enzimele, iar „produsul final" — proteinele.

Reglarea activităţii diferitelor „linii de producţie", respectiv căi metabolice, corespunzînd fiecare unui anumit tip de „produs", recte de proteină, este de presupus a se face prin „semnale", care la nivel celular sînt reprezentate de molecule mici „mobile", şi prin „dispozitive receptoare" cu care pot fi echivalaţi „receptorii" macromoleculari apţi să traducă semnalele primite într-un tip determinat de activitate biologică.

Există trei căi prin care o uzină — şi în mod similar celula — poate controla randamentul activităţii sale: *1)* introducerea în funcţie a unui anumit tip de „dispozitiv de producţie" sau mărirea numărului de unităţi funcţionale de acest tip (în cazul celulei, a numărului de molecule dintr-o anumită enzimă); *2)* scoaterea din funcţie a unei anumite categorii de asemenea „dispozitive"; *3)* modificarea nivelului lor de activitate fără a se merge pînă la scoaterea lor din funcţiune. Acestor posibilităţi de dirijare a naturii şi volumului producţiei le corespund, în termeni de biologie celulară, mecanisme specifice de reglare a biosintezei, care au fost pentru prima oară descrise la bacterii, şi anume: *inducţia enzimatică*, *represia enzimatică* prin produs anabolic final sau prin catabolit şi *inhibiţia activităţii enzimelor*.

Studiile de enzimologie şi genetică bacteriană au permis punerea în evidenţă a unui ansamblu de procese moleculare care, prin jocul unor semnale

specifice, controlează la diferite nivele oportunitatea şi eficienţa diferitelor trepte metabolice. Aceste studii s-au dovedit a fi de o deosebită importanţă, deoarece valabilitatea datelor microbiologice este, după toate probabilităţile, susceptibilă de extindere la întreg domeniul lumii vii. Aşa a şi fost posibilă elaborarea unui model teoretic privind reglarea biosintezei proteinelor în general (Jacob şi Monod).

Bacteriile reprezintă un model experimental deosebit de adecvat pentru studiul mecanismelor de *autoreglare* datorită, pe de o parte, marelui volum de cunoştinţe existente cu privire la structura, compoziţia chimică, cultivarea şi genetica lor, iar pe de altă parte, simplităţii de organizare şi marii lor plasticităţi funcţionale. Simplitatea organizării interne şi deosebita plasticitate fiziologică a acestor organisme unicelulare le asigură supravieţuirea şi adaptarea chiar în cazul unor variaţii ale factorilor de mediu reprezentînd abateri relativ largi de la ceea ce reprezintă condiţiile optime ale activităţii metabolice caracteristice speciei. Dimpotrivă, activitatea vitală a celulelor cu un grad superior de diferenţiere este condiţionată de existenţa unui mediu aproximativ constant, iar reglarea ei se realizează prin intrarea în joc a unor mecanisme mult mai complexe. Mai mult decît atît, la organismele pluricelulare, mecanismelor de reglare celulară li se adaugă cele de homeostazie şi reglare funcţională a organismului ca întreg, ceea ce complică mult izolarea, urmărirea şi interpretarea fenomenelor.

În lumina datelor actuale, celula bacteriană apare ca un sistem integrat de macromolecule specifice, biologic active, caracterizate printr-o perfectă ordine funcţională rezultînd din interferenţe complexe între activitatea de „programare" a materialului genetic, procesele „efectoare" ale metabolismului celular şi mecanismele de „control" care dirijează biosinteza. La rîndul său, metabolismul este rezultatul interacţiunii dintre enzime şi substratul nutritiv furnizat de mediu. Strînsa interdependenţă a tuturor componentelor celulare şi integrarea lor într-un sistem unitar se datoresc faptului că în celula bacteriană normală toate moleculele active lucrează în armonie, deoarece fiecare dintre ele „ştie" ce are de făcut şi ce fac celelalte, primeşte mesaje chimice şi ascultă de ele şi, în acelaşi timp, se supune unui dublu control exercitat, pe de o parte, de informaţia codificată în materialul genetic, iar pe de altă parte, de factorii variabili ai mediului extern. De aceea, două celule genetic identice pot avea fenotipuri deosebite — în sensul de a elabora enzime diferite şi în cantităţi diferite — în funcţie de caracteristicile deosebite ale mediilor respective de viaţă.

Mecanismele de reglare reprezintă deci un sistem de coordonare în care se integrează într-un tot unitar: *a*) selecţia adecvată în raport cu mediul a informaţiei genetice care urmează a fi exprimată fenotipic şi care nu poate reprezenta decît o parte din totalul informaţiei păstrate şi transmise ereditar de genom de la o generaţie la alta; *b*) procesele de „transcriere" a acestei informaţii în vederea sintezei proteinelor după „programul" codificat în gene; *c*) realizarea cantitativ echilibrată a acestei sinteze şi *d*) desfăşurarea reacţiilor implicînd activitatea catalitică a proteinelor sintetizate.

Genomul bacterian depozitează, prin urmare, sub formă codificată, nu

numai planul arhitectural detaliat de structură a celulei, ci şi programul ei de activitate funcţională coordonată ca şi informaţia necesară funcţionării unor mecanisme de control capabile să asigure efectuarea adecvată, în raport cu cerinţele mediului, a tuturor proceselor fiziologice.

Mecanismele de reglare a activităţilor celulare se exercită la trei nivele diferite, care sînt — în ordinea crescîndă a complexităţii lor — următoarele: *1*) activitatea enzimelor; *2*) biosinteza proteinelor enzimatice, susceptibilă de a fi reglată prin cele două mecanisme esenţiale care sînt *inducţia* şi *represia;* *3*) multiplicarea celulară realizată prin diviziune.

a. Inhibiţia activităţii enzimelor (inhibiţia prin produs final, retroinhibiţia sau inhibiţia prin feedback [1])

Roberts (1955) a arătat că la *E. coli* substanţele exogene sînt folosite preferenţial în raport cu produşii echivalenţi, dar de natură endogenă. Ca urmare, prezenţa în mediu a unei substanţe identice cu produsul final al unei căi biosintetice celulare determină blocarea sintezei enzimelor care catalizează reacţiile de biosinteză a acestui produs. Procesul, denumit de *represie enzimatică*, este independent de originea în mediu a produsului care-l declanşează, în sensul că acesta poate la fel de bine să fi fost adăugat în mod artificial, sintetizat în exces sau rămas în parte neconsumat.

Dacă însă celula ar dispune pentru reglarea biosintezei numai de mecanisme de represie enzimatică, răspunsul ei adecvat la o modificare a mediului — constînd din creşterea concentraţiei lui într-un anumit metabolit final — nu ar fi foarte prompt, deoarece enzimele deja prezente în celulă şi-ar continua activitatea de sinteză şi astfel acumularea în exces a produsului respectiv ar continua. Această sinteză neeconomică este prevenită de intervenţia concomitentă a unui mecanism de reglare fină a cărui acţiune, de astă dată instantanee, constă în inhibarea sau blocarea funcţionării primei enzime a căii biosintetice respective sub acţiunea produsului final aflat în exces.

Cele două procese — de *represie enzimatică* şi de aşa-numită *retroinhibiţie* (inhibiţie prin „feedback" sau inhibiţie prin produs final) — sînt în realitate asociate, efectele lor completîndu-se reciproc în celulă.

Existenţa reglării prin retroinhibiţie a fost demonstrată în mai multe sisteme enzimatice la bacterii la care biosinteza diferiţilor metaboliţi (aminoacizi, nucleotide etc.), ca şi degradarea oricărui substrat, se realizează întotdeauna printr-o serie de trepte metabolice succesive catalizate fiecare de către o enzimă diferită. Prezenţa în mediu a produsului final al ultimei trepte metabolice de sinteză inhibă activitatea enzimei care catalizează prima treaptă a biosintezei şi, prin aceasta, întreaga serie de reacţii succesive este blocată, ea putînd fi pusă din nou în acţiune numai atunci cînd metabolitul respectiv lipseşte.

[1] Termenul *feedback*, tradus de obicei prin *retroacţiune, conexiune inversă, retrocuplaj, aferentaţie inversă* etc., esete folosit frecvent în forma originară, deoarece se consideră că nici una dintre expresiile de mai sus nu redă integral sensul termenului iniţial.

Scanned with OKEN Scanner

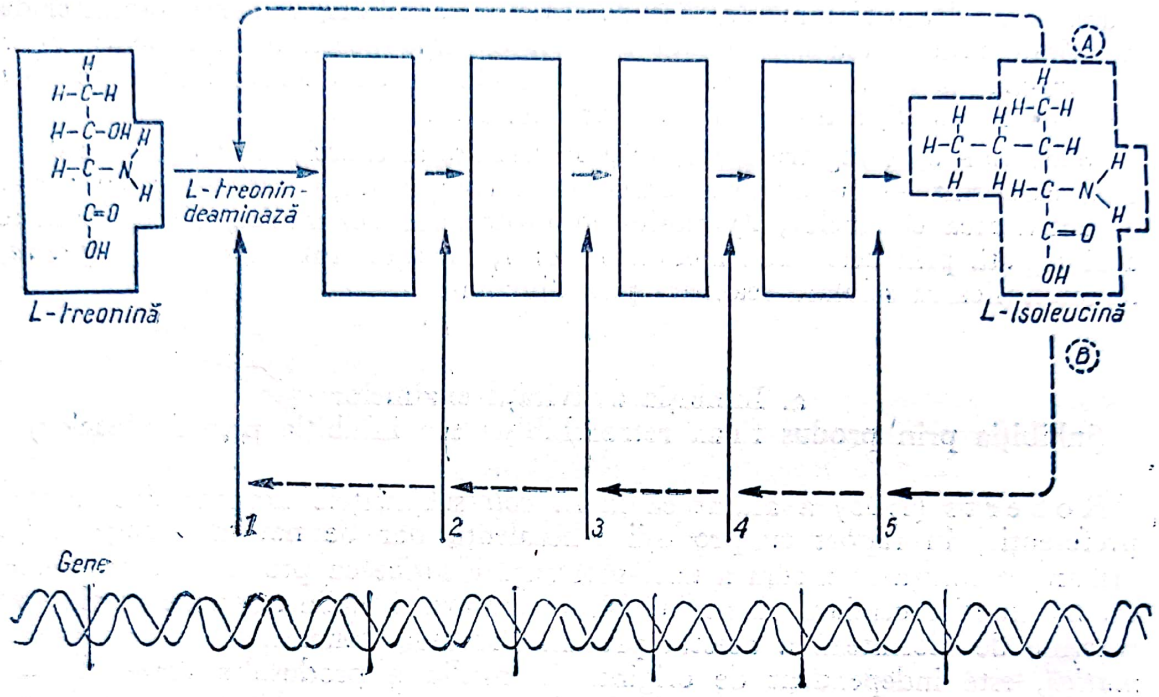


Fig. 304. Căile de biosinteză a *L*-izoleucinei pornind de la treonină. Acumularea izoleucinei în mediu prin biosinteză sau prin adăugarea din afară declanşează inhibarea activităţii *L*-treonindeaminazei care catalizează prima treaptă a procesului de biosinteză (după Watson).

De aici şi derivă desemnarea acestui mecanism de reglare prin denumirile de inhibiţie prin produs final, retroinhibiţie sau inhibiţie prin „feedback", aplicabile toate aceluiaşi fenomen, cunoscut încă şi sub numele de *efectul Novick-Szilard*. Grupul de enzime răspunzător de sinteza sau de degradarea unui anumit metabolit sau, în termeni mai generali, de o anumită secvenţă de reacţii, este denumit *zimon*. Toţi membrii unui zimon lucrează în armonie: o enzimă acţionează asupra produsului activităţii enzimei precedente, iar activitatea fiecărei enzime în parte depinde de activitatea tuturor membrilor zimonului.

Un exemplu tipic de biosinteză reglabilă prin retroinhibiţie îl constituie producerea *L*-izoleucinei la *E. coli*. Sinteza acestui aminoacid este efectuată, pornind de la *L*-treonină, printr-o serie de cinci etape metabolice succesive catalizate de cîte o enzimă specifică.

Dacă o tulpină de *E. coli*, cultivată pe un mediu minimal cu glucoză, este aprovizionată exogen cu *L*-izoleucină, prezenţa acestui aminoacid în mediu blochează activitatea enzimei implicate în prima treaptă a biosintezei — *L*-treonindeaminaza — şi astfel α-cetobutiratul, produsul de reacţie al acestei enzime, nu se mai formează. În felul acesta, celelalte enzime corespunzătoare reacţiilor 2, 3, 4 şi 5 din lanţul metabolic respectiv, care acţionează fiecare asupra metabolitului rezultat din activitatea celei precedente, sînt lipsite de produşii intermediari care reprezintă substratul lor specific şi, în consecinţă, activitatea întregului zimon este redusă sau blocată.

În afară de promptitudinea efectului său, retroinhibiţia are şi avantajul de a constitui un mecanism de reglare el însuşi extrem de economic, deoarece blocarea primei reacţii a unei căi metabolice antrenează implicit şi încetarea sintezei metaboliţilor intermediari corespunzători reacţiilor următoare din secvenţa întregii căi de biosinteză.

Mecanismul retroinhibiţiei. Modul de acţiune al sistemelor de control metabolic; proteinele alosterice. Monod, Changeux şi Jacob (1961, 1963) au propus un model general de reactivitate moleculară comun unui întreg ansamblu de sisteme de control metabolic, model menit să explice comportarea funcţională a proteinelor cu activitate regulatoare şi deci modul de lucru al acestor sisteme.

Conform concepţiei pe care se bazează acest model, enzimele ar fi proteine *alosterice*. Datorită structurii lor particulare, ele ar fi dotate cu proprietatea de a se asocia selectiv şi reversibil cu două sau mai multe tipuri de molecule chimic diferite, deseori lipsite de analogii structurale şi de orice activitate sau reactivitate chimică.

În forma lor cea mai simplă, moleculele de proteină alosterică ar avea cel puţin două suprafeţe reactive cu stereospecificitate diferită şi dispuse în poziţii net distincte: 1) „locul activ" al enzimei, la nivelul căruia ea se poate combina specific cu substratul, această suprafaţă a moleculei fiind deci „răspunzătoare" de activitatea biologică a proteinei-enzimă şi 2) „suprafaţa alosterică regulatoare", a cărei configuraţie este complementară aceleia a unui anumit metabolit, de obicei cu moleculă mică, numit *efector alosteric* şi, ca atare, se poate combina specific şi reversibil cu acest metabolit. Caracteristic este faptul că, după combinarea sa cu efectorul alosteric, molecula de proteină îşi modifică reversibil conformaţia printr-un proces aşa-numit de *tranziţie alosterică*, ceea ce antrenează modificări ale reactivităţii locului ei activ, traduse prin variaţii ale cineticii enzimatice. Ca urmare, proteinele alosterice astfel modificate pot să sufere alterări care privesc fie activitatea specifică, fie afinitatea pentru substrat a enzimei.

Efectul alosteric are deci caracter inhibitor, modificînd echilibrul intern al moleculei în sensul stării de inactivitate enzimatică. Inhibiţia alosterică trebuie deosebită de inhibiţia

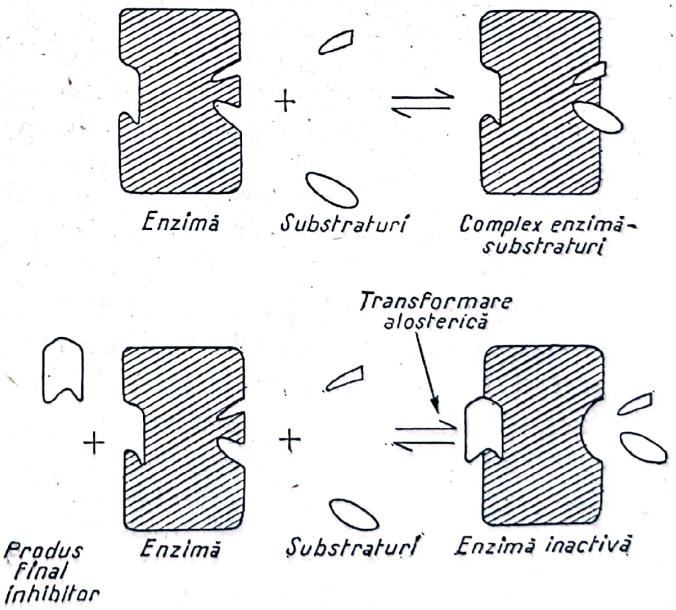


Fig. 305. Proteinele alosterice. Legarea suprafeţei catalitice cu substratul determină activitatea enzimei, în timp ce legarea unui inhibitor pe suprafaţa regulatoare schimbă configuraţia moleculei făcînd-o astfel inaptă de interacţiune cu substratul (tranziţie alosterică).

izosterică, în care inhibitorul este un analog chimic al substratului şi, ca atare, intră în competiţie cu acesta pentru combinarea cu una şi aceeaşi suprafaţă reactivă care este locul activ al moleculei de proteină-enzimă.

Enzimele, proteine alosterice, pot exista astfel în două forme reversibile: una în care se pot asocia cu substratul sau cu eventuali activatori şi alta în care se pot cupla cu inbitori (efectorul alosteric). Echilibrul între cele două forme este deplasat în funcţie de natura moleculelor mici care s-au legat de proteină. Graţie alosteriei moleculei lor, unele proteine-enzime joacă un rol regulator specific în cele mai multe căi de metabolism, dacă nu chiar în toate. Acest rol regulator se poate exercita datorită faptului că activitatea unor asemenea enzime este ea însăşi reglată, prin mecanismul de *inhibiţie alosterică*, de anumiţi metaboliţi — produşi sau precursori mai mult sau mai puţin îndepărtaţi ai căilor metabolice în care sînt implicate enzimele respective — metaboliţi a căror intervenţie asigură menţinerea homeostaziei celulare şi reglarea fluxurilor metabolice.

b. Inducţia sintezei enzimelor

În termeni de enzimologie, inducţia reprezintă iniţierea sintezei unei enzime sau creşterea relativă a vitezei acestei sinteze, ca rezultat al prezenţei în mediu a unei substanţe — cu funcţie de substrat inductor — pe care celula trebuie să o degradeze în compuşi mai simpli necesari pentru creştere. Dacă sinteza acestei enzime are drept consecinţă o mai bună adaptare la mediu, inducţia poate fi considerată ca fiind un proces de adaptare enzimatică. Încă din 1899, Duclaux a observat că anumite enzime microbiene se formează numai în prezenţa unui substrat specific. Karström (1938) a dat denumirea de enzime *adaptative* acelor enzime care apar în echipamentul enzimatic al unei bacterii numai dacă aceasta este cultivată pe un mediu care conţine substratul specific corespunzător, spre a le deosebi de enzimele *constitutive* a căror sinteză este permanentă, independent de prezenţa sau absenţa substratului în mediu.

În 1953 Monod şi Cohn arată că inductorul provoacă iniţierea sintezei *de novo* a unei enzime care este efectiv nouă pentru celulă, şi prin structura sa specifică şi prin originea elementelor sale componente.

Inducţia enzimatică a fost studiată pe larg în legătură cu galactozidaza de la *E. coli*. Majoritatea tulpinilor acestei specii, şi anume cele de tipul genetic lac^+, au proprietatea de a folosi lactoza ca unică sursă de C şi energie. La aceste tulpini, dizaharidul este introdus în celulă de un sistem transportor activ, constînd dintr-o proteină specifică, β-galactozid-permeaza, după care este scindat în glucoză şi galactoză sub acţiunea β-galactozidazei. Această ultimă enzimă lipseşte complet sau se găseşte numai în cantităţi foarte mici (1—10 U/mg substanţă celulară uscată, adică 0,5—5 molecule active/celulă) în celulele aceleiaşi tulpini cultivate pe medii fără lactoză. În prezenţa substratului inductor, ea începe însă, chiar după cîteva minute, să apară în cantităţi crescînde, care în circa 60 de minute ajung să reprezinte pînă la

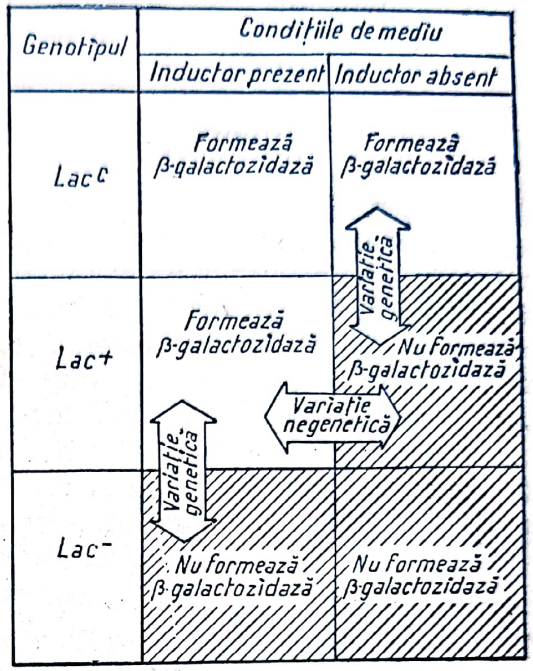


Fig. 306. Influenţa genotipului şi a condiţiilor de mediu asupra sintezei β-galactozidazei la *E. coli:* inducţia sintezei este posibilă la bacteriile cu genotipul adecvat *(lac⁺)* numai în prezenţa substratului în mediu. Sinteza încetează în absenţa acestuia *(variaţie negenetică)* sau în cazul unei mutaţii *(lac⁺ → lac⁻)*. Mutaţiile *lac⁺ → lacᶜ* determină sinteza enzimei necondiţionată de prezenţa substratului (după Adelberg).

10 000 U/mg substanţă uscată, adică 3—6 000 de molecule active/celulă, respectiv 3—6% din proteina totală a bacteriei. Dacă lactoza dispare din mediu, sinteza β-galactozidazei încetează brusc. Elaborarea de β-galactozidază în prezenţa substratului său specific, care acţionează ca inductor, şi absenţa ei atunci cînd lactoza, deci inductorul, lipseşte din mediu sînt independente de orice modificare la nivelul genomului care, de altfel, conţine la tulpinile respective determinantul lac^+. O tulpină de *E. coli* lac^+ poate însă suferi modificări mutaţionale la nivelul genei determinante a caracterului lac^+, de unde apariţia unor mutante lac^-, incapabile de a mai sintetiza β-galactozidaza, chiar dacă lactoza este prezentă în mediu, sau a unor mutante lac^c, aşa-numitele *mutante constitutive,* care fac sinteza acestei enzime indiferent dacă mediul lor conţine sau nu lactoză.

În cazul analizat, substratul enzimei constituie şi inductorul sintezei ei, adică factorul capabil să pună în mişcare în mod specific acest proces metabolic, care este determinat genetic, dar care nu se poate manifesta fenotipic decît dacă produsul lui potenţial — enzima — dispune de substratul său specific de acţiune. Dacă substratul inductor este degradat

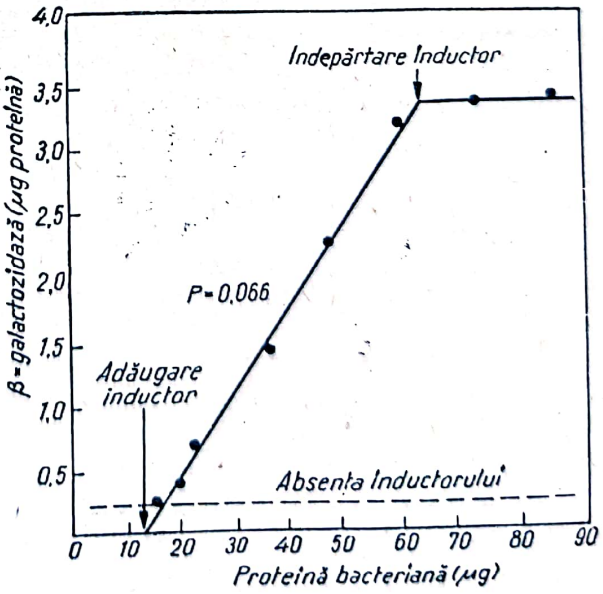


Fig. 307. Cinetica procesului de biosinteză a unei enzime induse într-o cultură de *E. coli.*

de-a lungul unor trepte metabolice constînd din mai multe reacţii enzimatice succesive, el poate declanşa sinteza unui întreg set de enzime inductibile.

Procesul se poate realiza pe două căi, şi anume: *1*) substratul inductor din mediu induce el însuşi, în mod nemijlocit, sinteza simultană a mai multor enzime ale căii metabolice pe care se face descompunerea sa, ceea ce corespunde fenomenului de *inducţie generalizată; 2*) substratul din mediu induce numai sinteza primei enzime implicate în degradarea sa, după care produsul metabolic intermediar rezultat din activitatea acesteia funcţionează mai departe ca substrat inductor pentru sinteza celei de-a doua enzime a căii catabolice respective. Apoi metabolitul intermediar corespunzînd acestei a doua trepte metabolice funcţionează, la rîndul său, ca inductor în biosinteza enzimei specifice celei de-a treia trepte catabolice şi aşa mai departe pentru toată secvenţa de reacţii enzimatice prin care se realizează catabolismul substratului inductor iniţial provenit din mediu; în acest caz este vorba de o *inducţie secvenţială*, întrucît substratul inductor provenit din mediul extern are numai rolul de a declanşa o serie de inducţii care se realizează în continuare sub acţiunea inductoare succesivă a fiecăruia dintre produşii intermediari de metabolism.

c. Represia sintezei enzimelor

Represia enzimatică (V o g e l, 1956), reprezintă fenomenul de scădere a vitezei de sinteză a unei anumite enzime sau a unui grup de enzime metabolic înrudite, ori chiar de oprire a elaborării lor, fenomen care survine ca urmare a prezenţei în celulă a unei anumite substanţe numită *represor*. Acest feno-

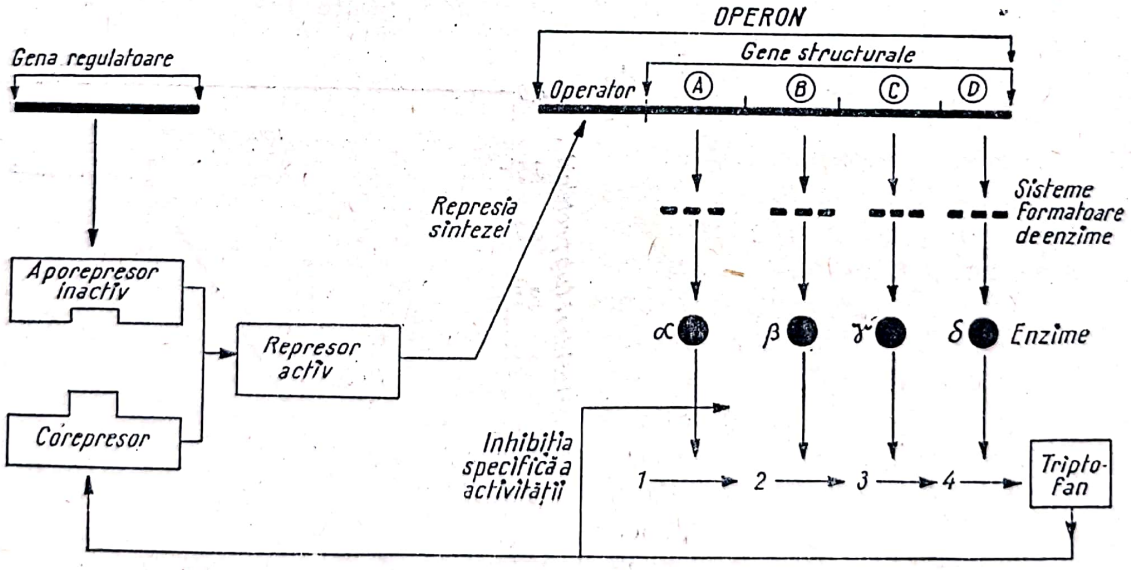


Fig. 308. Controlul activităţii şi sintezei enzimelor implicate în biosinteza triptofanului. Activitatea primei enzime este inhibată specific de prezenţa în mediu a produsului final al căii metabolice. Sinteza enzimelor este blocată de un represor format prin interacţiunea dintre aporepresorul produs de gena regulatoare şi corepresorul reprezentat de triptofanul prezent în mediu. Gena operatoare, aflată în poziţia „start" în absenţa represorului, este „comutată" în poziţia „stop" în prezenţa acestuia (după Lwoff).

men, denumit iniţial „adaptare negativă", a fost descris în 1953: prezenţa în mediul de cultură a triptofanului inhibă selectiv formarea triptofan-sintetazei care participă la biosinteza acestui aminoacid (Monod şi Cohen Bazire).

Diametral opusă inducţiei — considerată a fi un fenomen de „adaptare pozitivă" — represia, aşa-numita „adaptare negativă", prezintă totuşi unele analogii cu aceasta. Ambele fenomene, cu un caracter foarte specific, controlează viteza cu care sînt sintetizate proteinele-enzime, iar cinetica lor asemănătoare sugerează că ele ar putea fi manifestări diferite ale unor mecanisme de control în esenţă similare. Dar, spre deosebire de inducţie, care acţionează în procesele catabolice de degradare a substanţelor exogene, represia operează de obicei asupra enzimelor anabolismului implicate în sinteza unor metaboliţi esenţiali cum sînt aminoacizii, nucleotidele etc.

Substratul inductor este de obicei însăşi substanţa susceptibilă de a fi catabolizată sau un analog al ei, în timp ce metabolitul represor este în mod obişnuit produsul final al unei secvenţe anabolice sau un analog al produsului acestei reacţii de sinteză. Inducţia este, prin urmare, un proces cu efect pozitiv de declanşare sau intensificare a sintezei enzimelor inductibile, pe cînd represia constituie, dimpotrivă, un fenomen cu efect negativ, întrucît implică inhibarea sintezei enzimelor represibile. Represia — fenomen de blocare prin produs final a sintezei de enzime, adică represie prin *feedback* — nu trebuie confundată de retroinhibiţia sau inhibiţia prin *feedback*, proces foarte frecvent care poate surveni în acelaşi sistem de sinteză a enzimelor, dar care influenţează *activitatea* enzimelor şi nu însăşi sinteza lor.

Un exemplu de represie enzimatică se întîlneşte şi în cazul sintezei metioninei la *E. coli*. Această bacterie poate să crească pe medii sintetice lipsite de orice aminoacid, ceea ce echivalează cu capacitatea ei de a sintetiza singură toate blocurile de construcţie ale proteinelor, deci toţi metaboliţii esenţiali, printre care şi metionina. Reacţia de sinteză a acestui aminoacid se desfăşoară în patru trepte metabolice, dintre care ultima este catalizată de metioninsintetază (E_4).

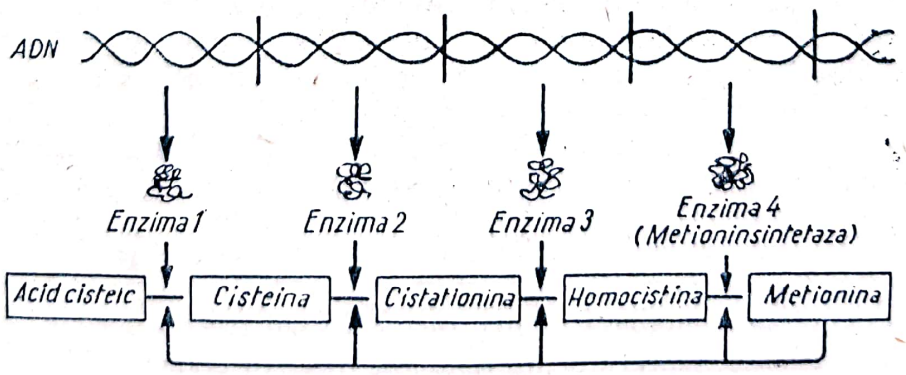


Fig. 309. Reprezentare schematică a treptelor metabolice de sinteză a metioninei la *E. coli* şi a procesului de reglare prin „feedback" a formării enzimelor în cazul prezenţei acestui aminoacid în mediu.

Dacă în mediul de cultură se adaugă metionină marcată cu un atom de S radioactiv, „cald", celula bacteriană încorporează acest aminoacid radioactiv şi, în acelaşi timp, încetează imediat sinteza metioninsintetazei. Prezenţa în mediu a produsului terminal al căii de biosinteză a metioninei reprezintă, prin urmare, un semnal pentru celulă care, printr-un fenomen de *feedback* negativ, adică de represie prin produs final, opreşte sinteza enzimei devenită inutilă, întrucît microorganismul foloseşte cu precădere metabolitul existent ca atare în mediu. Fenomenul de represie prin *feedback* se produce şi în condiţii naturale, atunci cînd un produs de biosinteză este format în exces faţă de nevoile celulei, în vederea realizării unei stări de echilibru între producţia şi consumul de metabolit.

Enzimele de biosinteză a căror elaborare este diminuată ca urmare a prezenţei produşilor lor finali de reacţie sînt denumite *enzime represibile,* iar metaboliţii finali, care în asociere cu un factor celular numit *represor* determină acest proces de scădere a sintezei de enzime, poartă numele de *corepresori.*

Represia prin catabolit constituie un tip particular de represie enzimatică determinată de produşi intermediari ai metabolismului glucidic şi acţionînd asupra unor enzime catabolizante prin blocarea specifică a sintezei lor.

În cazul acestui mecanism de control, în care represia intervine în sisteme inductibile, se admite că, pentru ca sinteza enzimei catabolizante respective să fie posibilă, este necesară intervenţia unui inductor. Într-un astfel de sistem, în celulă se sintetizează un represor *activ* care opreşte sinteza enzimei. În momentul în care represorul se combină cu un inductor, de exemplu glucoza, el este inactivat şi, ca atare, permite automat declanşarea reacţiilor de sinteză a enzimei inductibile corespunzătoare. Dacă însă represorul leagă un catabolit, cum este piruvatul, el suferă o tranziţie alosterică în urma căreia devine incapabil să mai lege inductorul şi astfel rămîne un represor activ capabil să blocheze formarea enzimei inductibile.

13. MODELUL GENERAL DE REGLARE A SINTEZEI PROTEINELOR

După modelul general de reglare a biosintezei proteinelor propus de Jacob şi Monod, procesul de represie se realizează sub controlul mai multor segmente cu funcţii caracteristice ale aparatului genetic celular. Asemenea segmente diferenţiate funcţional ale genomului alcătuiesc *sisteme de structură şi funcţie,* care împreună cu anumiţi produşi metabolici ai unora dintre elementele sistemului dirijează sinteza fiecărui grup de enzime de care depinde efectuarea unei anumite secvenţe metabolice. Identificate cu genele şi cu unele „semne de punctuaţie" din mesajul purtat de ADN, ele au fost descrise în detaliu pe baza a numeroase studii efectuate pe bacterii dar sînt considerate a avea o semnificaţie similară pentru metabolismul oricărei celule.

Genele structurale reprezintă secvenţe de dezoxiribonucleotide care determină structura specifică a fiecărei proteine. Rolul lor este de a servi ca *matriţă* pentru formarea unui ARN mesager care să dirijeze, la nivelul ribosomilor, aranjarea specifică a aminoacizilor într-o anumită secvenţă polipeptidică. Fie-

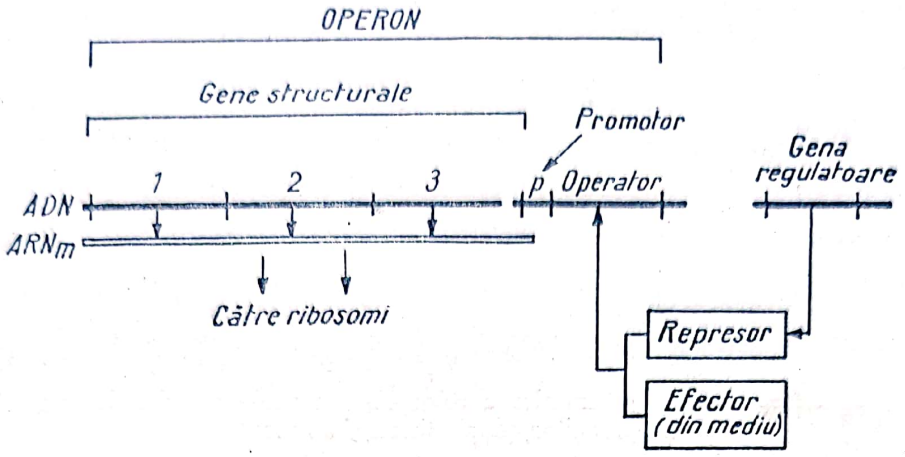


Fig. 310. Modelul general de structură al unui operon, după concepţia lui Jacob şi Monod privind mecanismul de reglare al sintezei enzimelor. În această reprezentare, operonul este format din 3 gene structurale (*1*, *2* şi *3*) capabile să determine sinteza a trei proteine diferite.

care polipeptid este deci determinat specific de o genă bine definită. Genele structurale care guvernează sinteza diferitelor enzime implicate în aceeaşi secvenţă metabolică ocupă în mod obişnuit pe cromozomul bacterian loci adiacenţi, ceeace dovedeşte că există o corelaţie remarcabilă între structurile genetice şi funcţiile genetice şi funcţiile biochimice ale celulei.

Gena operatoare este un segment cromozomic adiacent genelor structurale, care nu conţine, de fapt, informaţie genetică pentru sinteza de proteine, ci funcţionează doar ca un *receptor* specific de „semnale" parvenite din citoplasmă, la care ca răspuns poate pune în funcţie sau întrerupe activitatea genelor structurale vecine. Operatorul funcţionează probabil ca un dispozitiv de control obişnuit, putînd deci exista în două stări alternative: „deschis" sau în poziţia de „start", ceea ce permite sinteza de proteine sub controlul genelor structurale, şi „închis" sau în poziţia de „stop", în care caz se blochează transcrierea informaţiei genelor structurale în ARN_m, deci producerea proteinelor corespunzătoare. În mod normal, el face ca genele structurale să iniţieze sinteza de ARN_m printr-un proces secvenţial, orientat, de copiere a ADN în ARN complementar.

Operonul reprezintă unitatea genetică de structură şi funcţie constînd dintr-o porţiune a genomului bacterian formată din gena operatoare şi genele structurale adiacente, segmente de ADN genetic înrudite şi controlînd o aceeaşi secvenţă metabolică. Jacob şi Monod au propus două modele pentru explicarea modului în care, sub controlul unui operon, se poate face transcrierea în ARN_m a informaţiei genetice codificate în genele structurale corespunzătoare. Conform primului model, exprimat sintetic prin formula „o genă — un mesager", intrarea în funcţie a operatorului ar determina copierea separată a fiecărei gene din operon în cîte un ARN_m complementar, care dirijează sinteza unei proteine anumite. După cel de-al doilea model, căruia îi corespunde formula „un operon — un mesager", model sprijinit de probele aduse

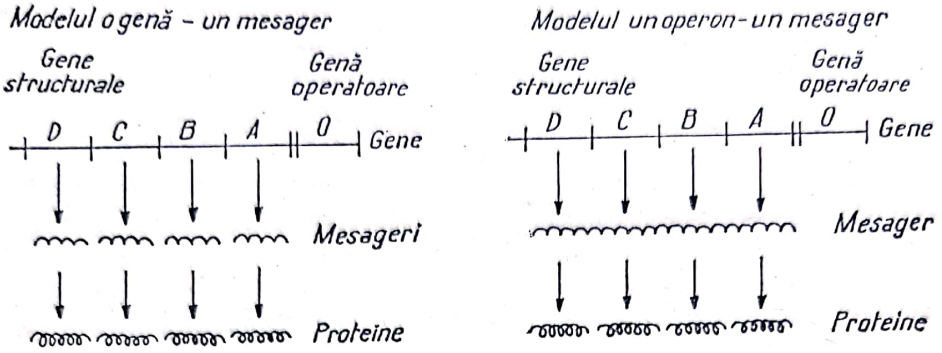


Fig. 311. Reprezentare schematică a celor două modele posibile de transcriere a operonilor (după Jacob şi Monod).

de Spiegelman (1963, Martin (1963) şi alţii, transcrierea ansamblului de gene structurale ale unui operon s-ar face ca atare, sub forma unui singur ARN_m „tradus" apoi succesiv în mai multe proteine distincte. Operonul — entitate genetică intermediară între cromozom şi genă — apare deci ca o unitate funcţională de *transcriere* integrală a informaţiei corespunzătoare unei secvenţe de reacţii metabolice de sinteză, deoarece un singur operator comun poate controla activitatea unui întreg grup de gene structurale adiacente.

Promotorul, punct de iniţiere al sintezei ARN_m, reprezintă un segment al moleculei de ADN cu poziţie intermediară între genele structurale şi operator, a cărui intervenţie este necesară pentru exprimarea genelor structurale dintr-un operon. Promotorul corespunde probabil unuia dintre „semnele de punctuaţie" necesare fie pentru *transcrierea*, fie pentru *traducerea* mesajului genetic.

Gena regulatoare este o unitate genetică de control care acţionează ca un transmiţător de semnale şi, prin aceasta, *reglează* funcţionarea genelor structurale, determinînd viteza cu care informaţia genetică este transmisă în ARN_m şi tradusă în proteine. Prin urmare, dacă genele structurale prescriu secvenţa aminoacizilor în proteinele-enzime, gena regulatoare determină rata sintezei acestor enzime prin controlul pe care, împreună cu promotorul şi operatorul, îl exercită asupra transcrierii în ARN_m a mesajului genetic corespunzător. Acest proces de reglare a vitezei de sinteză a proteinelor se realizează indirect, graţie capacităţii genei regulatoare de a determina sinteza unei molecule numită *represor*, prezentă în citoplasmă. Represorul este capabil să se asocieze reversibil cu operatorul, ceea ce blochează, sau, invers, deblochează transcrierea întregului mesaj purtat de operon şi, ca atare, opreşte sau, respectiv, declanşează sinteza proteinelor omologe.

Represorul este, prin urmare, un constituent citoplasmatic macromolecular sintetizat sub acţiunea unei anumite gene regulatoare, care îi determină structura şi specificitatea de acţiune. Această acţiune se traduce prin reglarea biosintezei unei proteine, în vederea asigurării unui randament de sinteză adaptat nevoilor celulare. Dovada semnificaţiei adaptative a activităţii represorului constă în faptul că mutantele constitutive care au gene regulatoare inactive, elaborează enzimele corespunzătoare operonilor respectivi, independent de

nevoile reale ale celulei, de unde prezenţa la aceste mutante a aşa-numitelor proteine constitutive.

Capacitatea represorului de a acţiona ca un *regulator chimic*, sensibil la prezenţa chiar în cantităţi infime sau la absenţa unor substanţe chimice-semnal, este determinată de posibilitatea acestui constituent citoplasmatic de a se asocia specific cu un metabolit sau cu un altul şi de a determina — în funcţie de natura metabolitului asociat — fie declanşarea, fie blocarea biosintezei enzimelor dependente de operonul pe care-l controlează. Aşadar, represorii nu au prin definiţie rolul exclusiv de a bloca specific sinteza unei proteine. Ei pot, în realitate, să existe în două forme: una activă, de *represori propriu-zişi*, şi alta inactivă, de *aporepresori*, în funcţie de natura moleculelor mici, foarte specifice, cu care se combină şi care sînt capabile fie să-i activeze, fie să-i blocheze. În forma sa activă, represorul are afinitate pentru operator cu care se combină, ceea ce blochează procesul de bionsinteză controlat de operonul respectiv.

Moleculele de metaboliţi care activează represorii inactivi — aporepresorii — se numesc *corepresori*. Sub acţiunea lor, represorul activat blochează transcrierea în ARN_m a mesajului purtat de genele structurale. Moleculele mici care inactivează represorul, transformîndu-l în aporepresor, şi care prin aceasta fac posibilă intrarea în funcţie a operatorului, deci sinteza proteinelor, se numesc *inductori*.

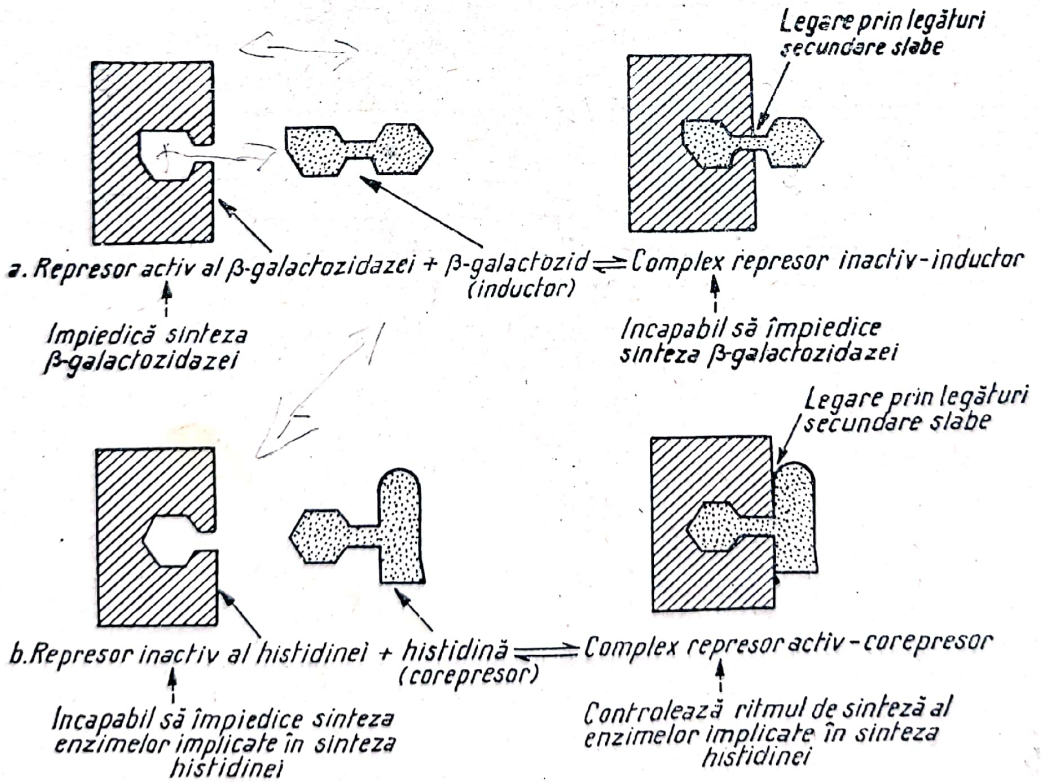


Fig. 312. Reprezentare schematică ilustrînd efectele opuse ale substanţelor inductoare şi ale corepresorilor asupra activităţii enzimelor.

Represorii sînt, prin urmare, molecule cu rol de *semnal chimic* a căror stare funcţională este determinată de prezenţa corepresorilor şi a inductorilor. Guilbert şi Miller Hill au izolat din tulpini de *E. coli* o proteină cu gr. mol. 150 000—200 000, care poate bloca sinteza β-galactozidazei la tulpinile la care această enzimă este inductibilă. Proteina cu funcţie de represor se găseşte în celulele bacteriene respective în cantitatea infimă de 1 moleculă la 10^4 proteine celulare.

După Monod (1963), comportarea represorului în fenomenele de inducţie şi de represie poate fi cel mai bine explicată dacă se presupune că el ar fi o proteină cu proprietăţi alosterice înzestrată cu două suprafeţe specifice de combinare: una pentru gena operatoare a operonului respectiv şi alta pentru o moleculă-efector cu greutate moleculară mică, moleculă care poate reprezenta un inductor, de exemplu lactoza, sau un produs terminal al unei secvenţe metabolice, de exemplu un aminoacid.

14. MECANISMUL DE REGLARE A REACŢIILOR CATABOLICE LA BACTERII. REGLAREA INDUCŢIEI ENZIMATICE

Mecanismul de reglare prin inducţie enzimatică a fost bine studiat în legătură cu sinteza β-galactozidazei, la *E. coli*.

Unele tulpini de *E. coli* dispun de enzima care catalizează scindarea lactozei numai atunci cînd acest dizaharid se găseşte în mediu, deoarece pentru asemenea tulpini el are nu numai calitatea de substrat al acţiunii β-galactozidazei, ci şi pe aceea de inductor al biosintezei ei. Sinteza inductibilă a β-galactozidazei este controlată de operonul *lac*, care are următoarea alcătuire:

— *Trei gene structurale adiacente*, dispuse în ordinea *z*, *y*, *a*, controlînd respectiv biosinteza β-galactozidazei (care scindează lactoza în glucoză şi galactoză), a galactozid-permeazei (care asigură transportul activ al lactozei în celulă) şi a β-galactozid-transacetilazei, enzime care sînt implicate — în ordine inversă aceleia în care sînt enumerate aici — în catabolismul lactozei.

— O *genă regulatoare sau de control „i"*, care determină formarea unei proteine-represor: la bacteriile normale, purtătoare ale alelei i^+ a acestei gene, represorul dependent de ea împiedică formarea β-galactozidazei atunci cînd lactoza lipseşte din mediu, în timp ce la mutantele i^-, la care nu se mai formează proteina-represor, sinteza celor trei enzime implicate în degradarea lactozei este constitutivă şi nu inductibilă, în sensul că în lipsa factorului represor această sinteză are loc indiferent dacă mediul conţine sau nu lactoză.

— *Promotorul*, secvenţă nucleotidică la nivelul căreia se iniţiază transcrierea în ARN_m a mesajului purtat de genele structurale ale regiunii *lac*.

— *Gena operatoare* O, capabilă să recepţioneze semnalul elaborat de gena „*i*" şi să răspundă adecvat la acţiunea acestui semnal chimic cu funcţie de represor.

În absenţa lactozei, substrat al acţiunii şi în acelaşi timp inductor al sintezei β-galactozidazei, *E. coli* i^+ nu elaborează nici una dintre enzimele codificate de operonul *lac*. Aceasta însemnă că, în celulele normale, alela i^+ a genei de reglare determină sinteza continuă de represor care, dacă în mediu nu se

găseşte lactoză, acţionează asupra operatorului O şi, prin intermediul acestuia, blochează activitatea întregului operon *lac*. Ca urmare, informaţia codificată în genele structurale *z*, *y*, *a*, determinanţi ai sistemului enzimatic de degradare a lactozei, nu mai este transcrisă în ARN_m, deci nu se mai poate exprima fenotipic. Dacă însă în mediu există lactoză, aceasta acţionează ca un inductor de biosinteză prin aceea că se combină cu represorul. Astfel legat, represorul îşi modifică structura şi, ca atare, îşi pierde afinitatea pentru operator, deci şi capacitatea de a bloca operonul prin intermediul acestuia. Ca urmare, concentraţia celulară în represor activ scade, iar operatorul rămas nereprimat trece de la poziţia „stop" la poziţia „start", care permite iniţierea transcrierii în ARN_m a informaţiei codificate în genele structurale *z*, *y*, *a*.

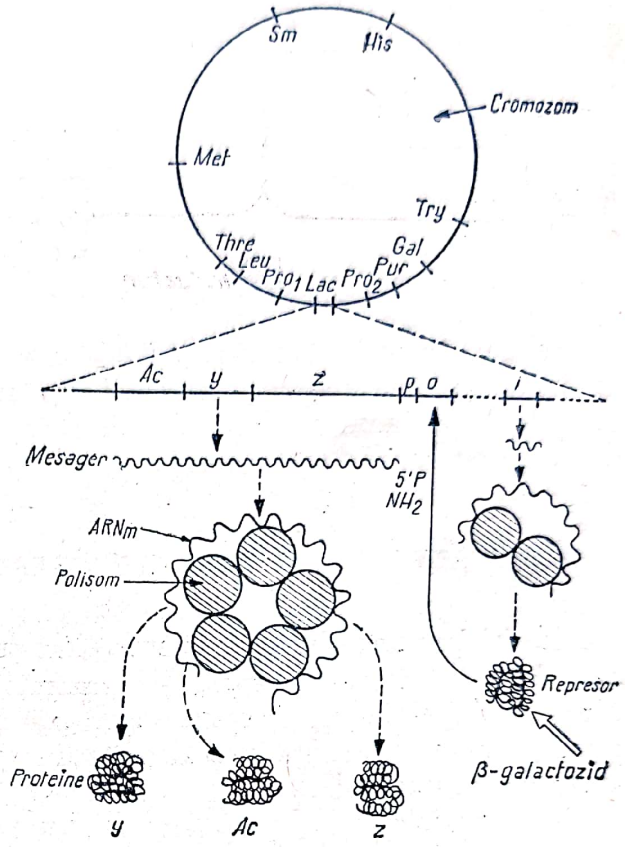


Fig. 313. Structura genetică a regiunii *lac* (care controlează degradarea lactozei) la *E. coli*. Schema ilustrează poziţia relativă a regiunii *lac* în raport cu ceilalţi markeri genetici pe cromozomul bacterian precum şi structura acestei regiuni:

i — genă regulatoare; *o* — operatorul; *p* — promotorul; *z* — genă structurală a β-galactozidazei; *y* — idem pentru β-galactozid-permeză; *Ac* — idem pentru β-galactozid-transacetilază. Cele trei gene structurale sînt transcrise într-un singur ARN_m, care se asociază cu un grup de ribosomi — formînd un polisom la nivelul căruia sînt sintetizate cele trei proteine diferite. Gena regulatoare (*i*) determină sinteza unui represor specific (*R*) care, acţionînd asupra operatorului (*o*) blochează producerea ARN_m şi deci sinteza proteinelor. Inductorul reprezentat de β-galactozid inactivează represorul ceea ce face posibilă producerea de ARN_m şi, ca atare, sinteza proteinelor determinate de operonul respectiv (după Jacob).

Aşadar, la *E. coli* normal, produsul citoplasmatic al genei regulatoare, *represorul*, inhibă exprimarea genelor structurale, ceea ce are ca efect blocarea sintezei enzimelor codificate de aceste gene. Inducţia aceleiaşi sinteze este rezultatul unui proces similar de blocare realizat de astă dată la alt nivel, şi anume asupra activităţii inhibitorului reprezentat de represorul activ. Ceea ce însă nu se ştie este dacă acţiunea inductorului interferă cu însăşi formarea sau numai cu activitatea represorului. În orice caz, cuplarea represorului cu inductorul pare a se face la nivelul unor suprafeţe de combinare specifice cu caracter complementar, unde se formează legături slabe care se stabilesc şi se rup cu uşurinţă.

Această modalitate de reacţie permite o ajustare rapidă a represorului, de la starea sa activă la cea inactivă şi invers, în funcţie de nevoile fiziologice

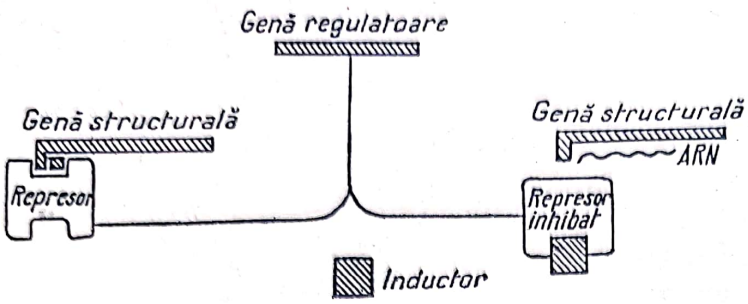


Fig. 314. Reprezentare schematică a modului de funcţionare a unui sistem inductibil (după Lamotte).

ale celulei. În plus, întrucît ARN_m este o moleculă instabilă, viteza sintezei lui condiţionează în mod direct viteza sintezei proteinelor. Ca urmare, imediat după ce lactoza din mediu a fost consumată, sinteza enzimelor dependente de operonul *lac* încetează.

15. MECANISMELE DE REGLARE A REACŢIILOR ANABOLICE LA BACTERII

Diferiţi produşi finali de metabolism (triptofanul, metionina, arginina etc.), care inhibă sinteza enzimelor în sistemele represibile, nu sînt activi în mod direct, prin ei înşişi. Aceasta sugerează că asemenea produşi ar putea interacţiona cu o substanţă preexistentă în celula bacteriană, aşa cum este, spre exemplu, *represorul*.

După modelul lui Jacob şi Monod, în sistemele represibile gena regulatoare ar determina sinteza unui represor care ar fi inactiv ca atare — un *aporepresor* — datorită totalei sale lipse de afinitate pentru operator. În prezenţa unui exces de produs final, un asemenea aporepresor ar fi activat prin combinarea sa cu moleculele mici, specifice, de metabolit final, care în acest caz ar funcţiona ca un *corepresor*. Activarea aporepresorului s-ar datora modificării structurii sale de suprafaţă, ca urmare a combinării cu corepresorul. Suferind o astfel de modificare de tipul tranziţiei alosterice, proteina-represor ar deveni aptă de a se fixa pe operatorul respectiv, blocîndu-i astfel activitatea.

Represia poate fi asemănată ca funcţie cu o barieră de cale ferată, care în mod normal ar fi închisă şi care s-ar deschide periodic numai atîta timp cît ar fi necesar pentru trecerea vehiculelor adunate în faţa ei. Cîtă vreme în mediu se găseşte un anumit produs metabolic final, de exemplu izoleucina,

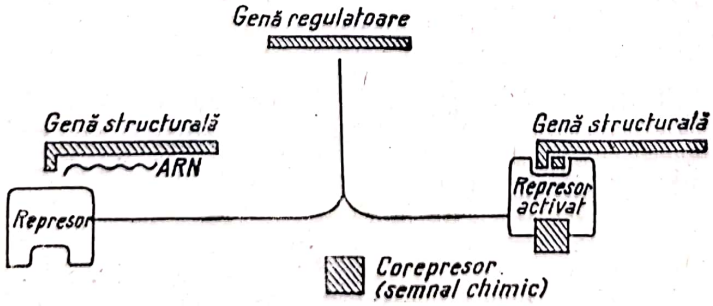


Fig. 315. Reprezentare schematică a modului de funcţionare a unui sistem represibil (după Lamotte).

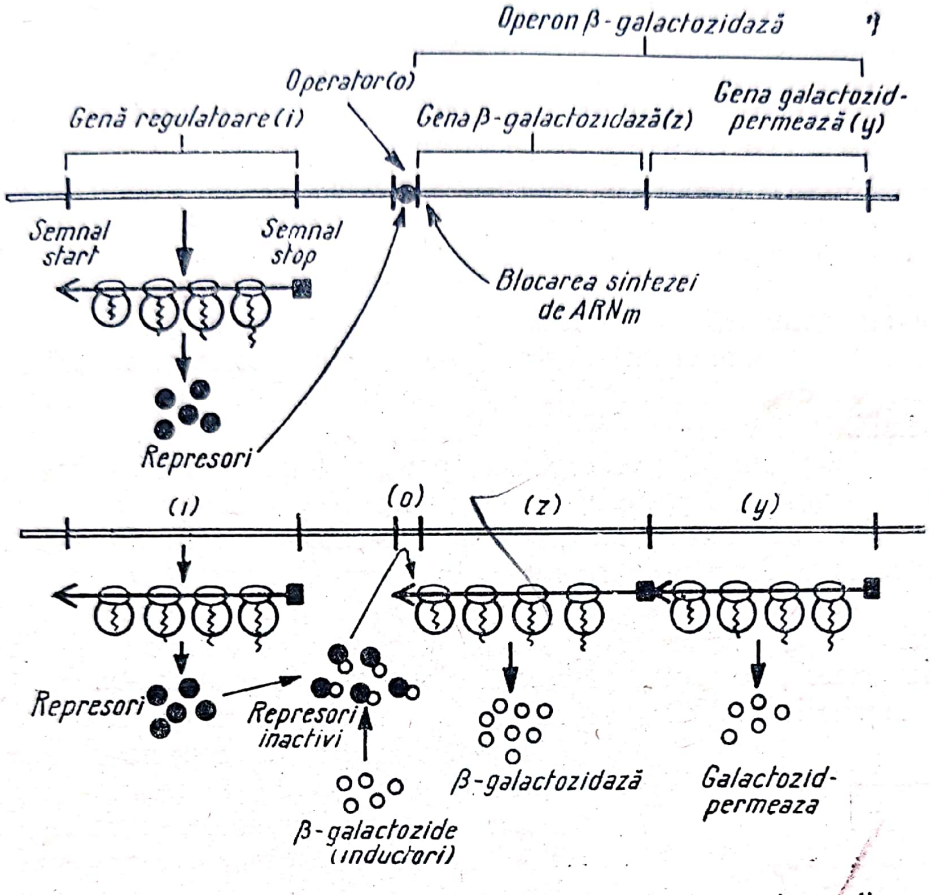


Fig. 316. Reprezentare schematică a modului de interacţiune dintre represor, corepresor şi operator în reglarea sintezei enzimelor la *E. coli*: *sus* — represorul activ se combină cu gena operatoare din structura ADN şi blochează sinteza; *jos:* represorul este inactivat prin combinarea sa cu substratul celor două enzime şi, ca urmare, sinteza acestora este posibilă (după Wattson).

represorul este activat de acest metabolit şi astfel poate bloca acţiunea operatorului: bariera este închisă, deci celula nu face sinteză de izoleucină, ci foloseşte numai metabolitul respectiv existent în mediu, cu atît mai mult cu cît, graţie fenomenului de retroinhibiţie, este blocată şi activitatea enzimelor deja sintetizate anterior represiei şi existente încă în celulă. În momentul în care metabolitul din mediu este consumat, represorul — care acum nu mai dispune de corepresor cu care să se combine — redevine inactiv, adică un aporepresor. Astfel, represia este abolită, ceea ce deblochează operatorul şi, prin aceasta, permite activitatea operonului care determină elaborarea enzimelor implicate in sinteza acestui metabolit. Tot ca urmare a epuizării metabolitului din mediu, încetează şi retroinhibiţia activităţii enzimatice implicate în elaborarea lui, astfel încît enzimele sintetizate în urma deblocării operonului pot acţiona nestingherit în calea anabolică de formare a acestui produs pe care celula este obligată acum să-l obţină pe cale endogenă. Aşadar, întocmai cum bariera este ridicată din timp în timp, tot astfel acţiunea represorului elaborat

de gena regulatoare este temporar sistată, şi anume pentru intervalul de timp necesar unor sinteze utile, după care întreruperea activităţii operonului, ca şi oprirea circulaţiei la barieră se instalează din nou.

Este probabil, pe de altă parte, ca factorul specific capabil să inactiveze represorul să poată fi reprezentat de prezenţa în mediu nu numai a unor produşi anabolici, ci şi a diferite substraturi chimice (echivalente vehiculelor din exemplul de mai sus), care pentru a fi catabolizate de celulă fac necesară sinteza enzimelor de degradare corespunzătoare. Prin urmare, represia poate fi anulată şi de nevoia de enzime. Atunci cînd enzimele respective s-au acumulat în cantitate suficientă pentru a degrada substratul, bariera pe care o constituie represorul se închide din nou, pînă cînd sosesc alte „vehicule", respectiv pînă cînd în mediu apare din nou o cantitate de substrat utilizabil pentru celulă.

În felul acesta, inducţia şi represia apar ca două fenomene strîns înrudite şi corelate întrucît se integrează în mecanisme de reglare similare prin esenţa lor: declanşarea sau blocarea sintezei de proteine sub acţiunea unei substanţe citoplasmatice cu funcţie de represor. În sistemele inductibile, represorul este în mod normal activ, adică se află în poziţia „stop". Inactivarea lui prin fixarea semnalului chimic inductor reprezentat de un substrat nutritiv îl trece în poziţia „start", ceea ce declanşează biosinteza de proteină-enzimă prin iniţierea transcrierii în ARN_m specific a secvenţelor corespunzătoare de ADN. În sistemele represibile, represorul este în mod normal inactiv, deci în poziţia „start" care permite sinteza proteinelor-enzime. Combinarea lui cu semnalul chimic reprezentat de metabolitul final cu rol de corepresor îl activează, deci îl trece în poziţia „stop", ceea ce are ca efect blocarea sintezei proteice.

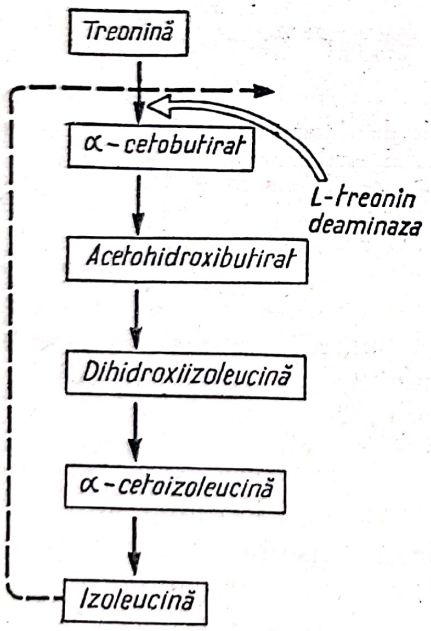


Fig. 317. Mecanismul de dublu control al sintezei *L*-izoleucinei la *E. coli:* inhibiţia activităţii primei enzime din calea metabolică şi represia sintezei enzimelor sub acţiunea acumulării în mediu a produsului final.

16. CONTROLUL COORDONAT AL ACTIVITĂŢILOR CELULARE

Existenţa a două procese de control prin *feedback* corelate funcţional — retroinhibiţia şi represia enzimatică prin produs final — a fost demonstrată la *E. coli* în legătură cu sinteza *L*-izoleucinei.

Adăugarea în exces în mediu a acestui aminoacid radioactiv determină în primul rînd inhibarea activităţii *L*-treonin-deaminazei, enzimă care catalizează prima treaptă din lanţul reacţiilor de biosinteză a *L*-izoleucinei, iar apoi blocarea sintezei tuturor enzimelor anabolizante prin care se realizează biosinteza lui în celula bacteriană. Cantitatea de aminoacid prezent în mediu sau sintetizat de celulă acţio-

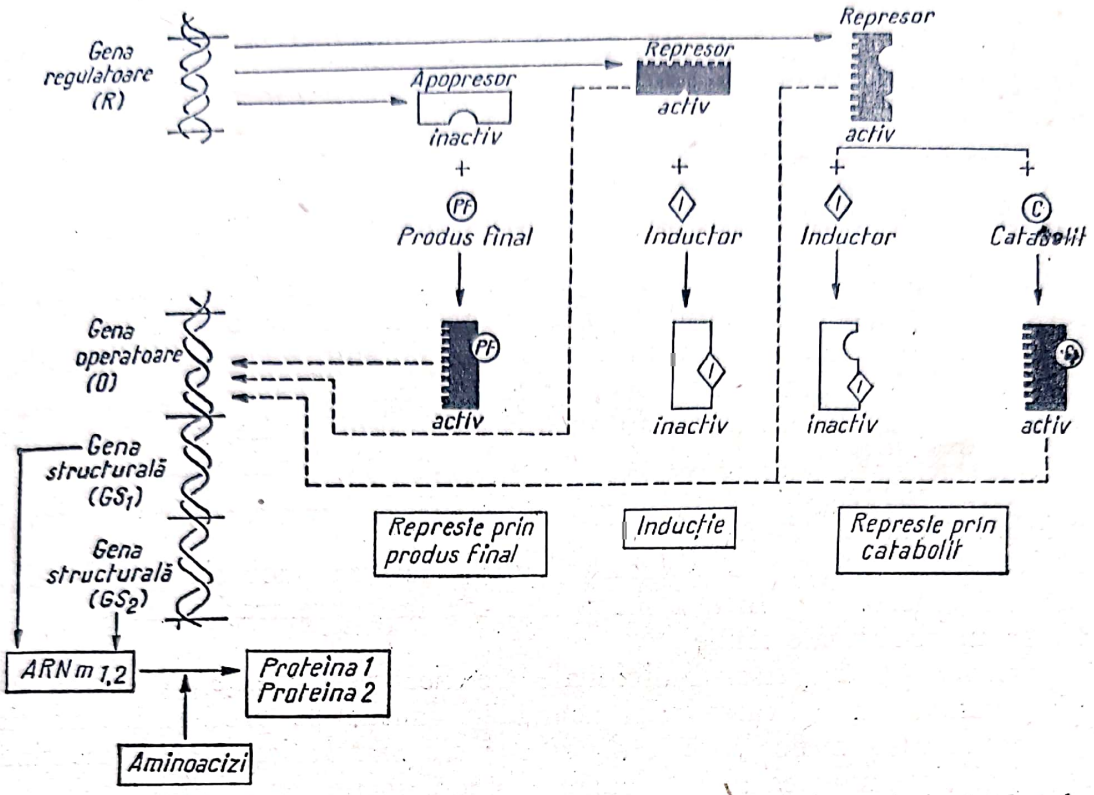


Fig. 318. Modelul general de control al biosintezei proteinelor la bacterii după Monod, Changeux şi Jacob, ilustrînd mecanismele de acţiune ale inducţiei, represiei, retroinhibiţiei şi represiei prin catabolit. Substanţa represoare produsă sub controlul genei regulatoare este reprezentată compact (în negru), în forma sa activă (cînd inhibă operatorul) şi numai în contur în forma ei inactivă.

neazǎ, în cazul represiei, ca un semnal de control: creşterea concentraţiei lui peste un anumit nivel îi stopează biosinteza. Aşa cum nivelul temperaturii dintr-un termostat reglează prin retrocontrol un sistem de încălzire, declanşînd sau oprind intrarea în funcţie a sursei de căldună, nivelul de concentraţie a *L*-izoleucinei în celulă exercită un control de tip *feedback* negativ asupra producţiei lui, determinînd oprirea sintezei tuturor enzimelor necesare anabolismului *L*-izoleucinei.

Sub raportul determinismului lor genetic, cele două mecanisme de control prin *feedback* sînt distincte, în sensul că sînt susceptibile de variaţie independentă: unele mutante pierd numai capacitatea de a inhiba activitatea enzimelor, deci metabolismul lor nu mai poate fi reglat prin retroinhibiţie, în timp ce altele devin incapabile să stopeze însăşi producţia de enzime, adică sînt private de aptitudinea de reglare prin represie; mutaţiile respective au de altfel sedii diferite pe cromozomul bacterian.

Dacă, în exemplul citat, procesele de represie şi retroinhibiţie s-ar limita la zimonul care coordonează sinteza izoleucinei, ar fi de aşteptat ca în celulă să se producă o acumulare de *L*-treonină, precursorul acestei sinteze. Fenomenul nu are totuşi loc în realitate, deoarece *L*-treonina (aminoacid cu funcţie de precursor direct în sinteza proteinelor, deci el însuşi produs final al unui lanţ de reacţii anabolice) declanşează, la rîndul său, prin concentraţia

intracelulară la care ajunge, un fenomen de *feedback* similar, care acţionează asupra propriilor reacţii de biosinteză ş.a.m.d. Astfel toate căile anabolismului, indiferent de complexitatea lor, se supun prin jocul acestor mecanisme unui sistem general de reglare.

17. IMPORTANŢA REGLĂRII METABOLICE PENTRU BIOLOGIA BACTERIILOR

Descoperirea mecanismelor de reglare genetică a metabolismului bacterian a furnizat explicaţia extraordinarei capacităţi a acestor organisme de a se adapta la medii noi şi de a utiliza cu mare eficienţă resurse nutritive dintre cele mai diferite. Graţie acestor mecanisme, celula bacteriană nu risipeşte niciodată substanţele nutritive sau energia în sinteze inutile, ci produce întotdeauna metaboliţi intermediari şi enzime în cantităţi echilibrate.

În cursul proceselor de metabolism bacterian trebuie reglate corect trei tipuri de activităţi:

1) influxul şi *efluxul de substanţe*, adică trecerea unor compuşi în şi din celulă, în vederea stabilirii şi menţinerii lor în concentraţii corespunzătoare nevoilor metabolice ale celulei;

2) coordonarea treptelor individuale ale fiecărei secvenţe de *reacţii enzimatice*, pentru împiedicarea unei acumulări inutile de produşi intermediari;

3) coordonarea armonioasă a *diferitelor căi metabolice*, pentru menţinerea integrităţii sistemului ca atare, deoarece predominenţa excesivă a uneia dintre aceste căi poate perturba echilibrul întregii economii celulare.

Graţie proceselor de reglare, căile metabolice ale bacteriilor sînt ajustate precis nevoilor organismului lor, care în mare măsură sînt condiţionate de compoziţia mediului.

Dacă nu survin restricţii majore în ceea ce priveşte exigenţele respiratorii, termice sau nutritive specifice unei tulpini date, dublarea numărului de celule este dictată de ratele de influx al metaboliţilor în celulă, de producerea de energie şi de efluxul metaboliţilor din celulă. Astfel, sinteza enzimelor necesare metabolismului energetic este reglată de prezenţa şi concentraţia diferitelor surse de energie din mediu, iar producerea enzimelor implicate în sinteza unui metabolit esenţial este controlată de concentraţia intracelulară a acestui metabolit, indiferent dacă provenienţa lui este endogenă sau exogenă. În plus, prin intermediul mecanismelor de reglare genetică, celula bacteriană îşi ajustează la nevoile sale metabolice nu numai însăşi sinteza enzimelor, ci şi nivelul de activitate a acestor catalizatori biologici.

Pentru realizarea unei reglări adecvate a dinamicii sale metabolice, celula bacteriană dispune de un sistem complex de *transmiţători* şi *receptori* de semnale chimice specifice prin intermediul cărora aparatul său genetic răspunzător de ansamblul manifestărilor vitale este „informat" în permanenţă asupra nevoilor celulare şi asupra posibilităţilor efective de reglare a biosintezei. Aceasta se datoreşte faptului că genomul bacterian conţine nu numai informaţia genetică necesară efectuării diferitelor sinteze specifice, ci şi planul desfăşurării lor coordonate, ceea ce asigură supleţa, deci „adaptabilitatea" întregului sistem. Graţie „informatorilor" săi chimici intracelulari, celula bacteriană „ştie" în orice moment ce componenţi să sintetizeze şi cît din

fiecare pentru ca dezvoltarea ei să fie cît mai economică, poate să „recunoască" substanţele nutritive utilizabile şi să „comande" elaborarea numai a acelor enzime care îi sînt efectiv necesare la un moment dat.

Valoarea posibilităţilor de adaptare ale celulei bacteriene o demonstrează fiziologia deficitară a mutantelor „neinteligente" izolate de Jacob şi Monod. Aceste mutante sînt incapabile să-şi ajusteze sintezele după necesităţi şi, ca atare, produc diferite proteine celulare în cantităţi mari chiar atunci cînd nevoile celulei sînt mici sau de-a dreptul nule. Ca urmare, risipa de energie cheltuită în acest fel scade în mod evident viteza de creştere a unor asemenea mutante.

Un rol esenţial în declanşarea mecanismelor de reglare îl are concentraţia diferiţilor metaboliţi în mediul intern al bacteriilor, concentraţie care, la rîndul său, depinde în cazul compuşilor endogeni de viteza lor de producere şi de utilizare, iar în cazul celor exogeni, de viteza pătrunderii lor în celulă. Intrarea coordonată în acţiune a diferitelor mecanisme de reglare asigură bacteriilor posibilitatea ca în limitele programului lor genetic specific — să dea un răspuns adecvat şi foarte rapid la modificările compoziţiei chimice intracelulare. Pentru a folosi o analogie cu limbajul, informaţia înscrisă în genom ar fi echivalentă unui text a cărui citire ar fi reglată de mecanisme indicînd ce frază sau ce pasaj trebuie citit la un moment dat în funcţie de anumite necesităţi operaţionale de moment, impuse de executarea instrucţiunilor conţinute în text.

În concluzie, prezenţa în mediu a produsului unei căi anabolice face inutilă sinteza lui intracelulară: produsul anabolic adăugat, exogen, este folosit preferenţial şi astfel sinteza tuturor enzimelor care asigură producerea lui endogenă nu mai este necesară şi, ca atare, este blocată prin **represie.**

Pe de altă parte, chiar în cazul cînd sinteza unor enzime a fost blocată prin represie, activitatea în continuare a enzimelor respective deja existente în celulă ar fi de asemenea neeconomică, întrucît permite acumularea mai departe a produsului anabolic devenit inutil. Ca atare, ea este împiedicată prin mecanismul de reglare fină reprezentat de **retroinhibiţie.** În fiecare secvenţă metabolică există o enzimă regulatoare care este, în general, cea dintîi din secvenţa respectivă. Dacă produsul final al secvenţei este prezent în mediu, el inhibă puternic, specific şi foarte rapid activitatea enzimei care catalizează prima reacţie a secvenţei şi, pe această cale, blochează în mod indirect şi treptele enzimatice următoare, care sînt private de substratele lor specifice, metaboliţi intermediari ai secvenţei respective.

Tot ca urmare a unor procese de reglare genetică, în contact cu un mediu nou sau modificat, care conţine, de exemplu, o sursă de C neutilizată anterior, bacteriile sînt capabile ca prin **inducţie** să realizeze o sinteză rapidă *de novo* a enzimelor necesare pentru utilizarea acestui nou substrat, înainte ca viabilitatea lor să fi fost afectată.

În esenţă deci, celula bacteriană dispune de două tipuri de mecanisme regulatoare:

1) Mecanisme cu acţiune rapidă, de control fin, care nu lucrează asupra sintezei enzimelor, ci direct asupra activităţii lor: procesele de *retroinhibiţie.*

Scanned with OKEN Scanner

2) Mecanisme cu acţiune întîrziată, de control mai larg, mai grosier, care intervin atunci cînd în compoziţia mediului apar modificări mari impunînd un anumit timp de latenţă pentru manifestarea răspunsului metabolic al celulei. Aceste mecanisme controlează viteza cu care se formează enzimele căilor metabolice respective şi determină fie iniţierea sintezei *de novo* a unor enzime *(inducţie)*, fie încetarea temporară a sintezei altora *(represie)*. Datorită intervenţiei lor, un sistem enzimatic este prezent atunci cînd necesitatea degradării unui substrat sau exigenţele unei biosinteze o cer şi absent atunci cînd activitatea sa catalitică nu este necesară. Adaptarea prin asemenea mecanisme nu este de tip „totul sau nimic", deoarece pentru satisfacerea unor nevoi intermediare reglarea se poate face şi ea la un nivel intermediar, şi anume acela al concentraţiei enzimelor. Un proces similar intervine şi în cazul sintezei proteinelor structurale: dacă bacteriile cresc cu viteză maximă, ribozomii reprezintă 25—30% din masa celulară, în timp ce în condiţii nefavorabile de creştere conţinutul în ribozomi al celulei poate să scadă pînă la a reprezenta doar 20% din cantitatea lor maximă posibilă.

Răspunsul metabolic rapid prin retroinhibiţie permite o adaptare imediată a celulei individuale la modificarea condiţiilor mediului, în timp ce reglarea funcţionalităţii enzimatice a celulei prin represie — proces care determină o adaptare mai puţin promptă la variaţiile mediului — este eficientă mai curînd la nivelul populaţiei bacteriene pe cale de creştere, decît la nivelul individului celular. În lipsa retroinhibiţiei, biosinteza produsului final al unei secvenţe enzimatice ar continua pînă cînd numărul moleculelor de enzimă deja elaborate în momentul blocării sintezei acesteia ar fi suficient micşorat în fiecare celulă în urma diviziunilor celulare succesive prin care se realizează multiplicarea bacteriilor.

18. VARIABILITATEA LA MICROORGANISME

Reproducerea microorganismelor, ca şi a tuturor organismelor din lumea vie, se face conform informaţiei depozitate în materialul lor genetic, ceea ce asigură conservarea proprietăţilor specifice de structură şi funcţie de la o generaţie la alta, adică ereditatea acestor însuşiri. Totuşi, este un fapt de observaţie curentă că, deşi descendenţii rezultaţi din procesele de reproducere seamănă foarte mult cu organismele parentale, cei mai mulţi indivizi progeni diferă de acestea printr-unul sau mai multe caractere. Variabilitatea are însă un caracter de excepţie prin aceea că ea reprezintă numai o abatere limitată în procesul de conservare a unui model biologic specific foarte complex. Ea se realizează prin două mecanisme esenţial diferite: variaţia fiziologică şi variaţia genetică.

Variaţia fiziologică sau negenetică a microorganismelor implică un proces de *adaptare fenotipică* directă, realizată pe calea unor modificări morfologice sau fiziologice netransmisibile, care se produc în urma dezvoltării normale a culturii microbiene sau ca răspuns direct la acţiunea unui factor neobişnuit din mediu. Populaţia modificată revine rapid la tipul normal, fie prin evoluţia naturală a culturii, fie prin reinstaurarea unor condiţii de mediu obişnuite. În toate aceste cazuri, modificarea survenită este pur fenotipică: ea afectează simultan

majoritatea celulelor dintr-o populaţie şi nu este ereditară, adică nu este transmisibilă generaţiilor următoare. Un exemplu demonstrativ îl constituie încetarea completă a producerii de clorofilă, pigment fotosintetizant elaborat numai în prezenţa energiei luminoase, la unele bacterii fotosintetizante cultivate la întuneric, aceste bacterii fiind capabile şi de chimiosinteză, proces care suplineşte în metabolism lipsa activităţii de fotosinteză. În mod similar, producerea de pigment la *Serratia marcescens* este inhibată prin cultivarea acestor bacterii la 37°, dar este reluată la temperaturi mai scăzute.

Variaţiile genetice, care corespund unor schimbări în ceea ce priveşte informaţia genetică, rezultate din modificări ale materialului genetic al celulelor, sînt mult mai stabile şi, fireşte, se transmit ereditar. Ele se realizează în primul rînd prin alterarea informaţiei genetice consecutiv în special unor erori de replicare care au ca efect apariţia de *mutaţii*. Pe de altă parte, microorganismele pot suferi variaţii genetice şi în urma proceselor de *recombinare genetică*. Prin recombinare, proces care asigură eficacitatea oricărui transfer de material genetic de la o celulă „donatoare" la o celulă „receptoare", se realizează „amestecul" şi „reasortarea" informaţiei genetice provenite de la organisme strîns înrudite în cadrul speciei dar diferite genotipic. Din diviziunea celulei receptoare în care a avut loc recombinarea genetică rezultă indivizi progeni al căror genotip reprezintă o combinaţie de genotipuri parentale, deci un complex de caractere genetice diferit de acela al fiecăruia dintre organismele parentale. În cazul bacteriilor, acest proces se poate realiza pe mai multe căi, în funcţie de natura şi modul de efectuare a transferului genetic, şi anume, pe de o parte, *transformarea genetică* şi *transducţia*, care asigură integrarea într-un genom a unei informaţii genetice străine, corespunzînd la 1—2 caractere noi, iar pe de altă parte, *conjugarea* care este însoţită în general de un transfer mai important de material genetic cromozomic sau de un transfer de episomi reprezentînd suplimente de material genetic extracromozomic.

a. Mutaţiile

Structura fizico-chimică a ADN, care permite moleculei sale să se reproducă într-o formă identică printr-o adevărată copiere în cursul procesului de replicare, îi conferă însuşirea de a fi substratul material ideal pentru asigurarea eredităţii organismelor. Cu toate acestea, stabilitatea informaţiei genetice purtate de molecula de ADN nu este absolută, deoarece mesajul care conţine această informaţie sub formă codificată în moleculă nu este inalterabil, ci este susceptibil de a suferi modificări denumite generic *mutaţii*. Variabilitatea, proprietate fundamentală a organismelor vii, este determinată tocmai de capacitatea materialului lor genetic de a se modifica prin mutaţie.

Mutaţiile reprezintă modificări spontane, cu caracter nedirecţional, care survin la nivel molecular în structura unor determinanţi genetici ai caracterelor ereditare şi care, afectînd astfel o parte din informaţia genetică a organismului, duc la construirea unui genotip „mutant", exprimat printr-un fenotip

diferit de cel normal, corespunzător genotipului „sălbatic". Ele pot avea ca sediu atît cromozomul — materialul genetic nuclear — cît şi episomii, fragmente de material genetic a căror localizare este extracromozomică, citoplasmică, cel puţin pentru o parte a existenţei lor.

Mutaţiile au următoarele caracteristici generale: *1) apar spontan* şi nu sînt direcţionate de mediu; *2) se transmit ereditar* la descendenţi şi *3) rata de producere a unei mutaţii este constantă* pentru un determinant dat şi pentru o tulpină dată. Aceste caracteristici nu implică totuşi o independenţă absolută a genomului faţă de mediu, deoarece, spre exemplu, unii agenţi ai mediului au proprietatea de a mări rata de apariţie a mutaţiilor care, în lipsa unei astfel de influenţe exogene, este în mod normal foarte mică. În plus, mediul are un rol important şi în favorizarea selectivă a supravieţuirii unor mutante, şi anume a celor care au dobîndit prin mutaţie caractere utile şi deci sînt mai bine adaptate condiţiilor existente. Spre exemplu, mutantele antibio- sau fagorezistente apar şi în absenţa antibioticelor sau a fagului, dar prezenţa acestor agenţi în mediu, nocivă pentru celulele normale, care sînt sensibile la acţiunea lor, selecţionează mutantele rezistente preexistente, în sensul că permit acestora să se multiplice intens, în timp ce înmulţirea populaţiei de celule „sălbatice" sensibile este total blocată.

Una dintre teoriile cele mai larg admise asupra genezei mutaţiilor este teoria *„copierii greşite"* în cursul replicării (Watson şi Crick, 1953). Conform acestei concepţii, atracţia normală care în molecula ADN leagă în

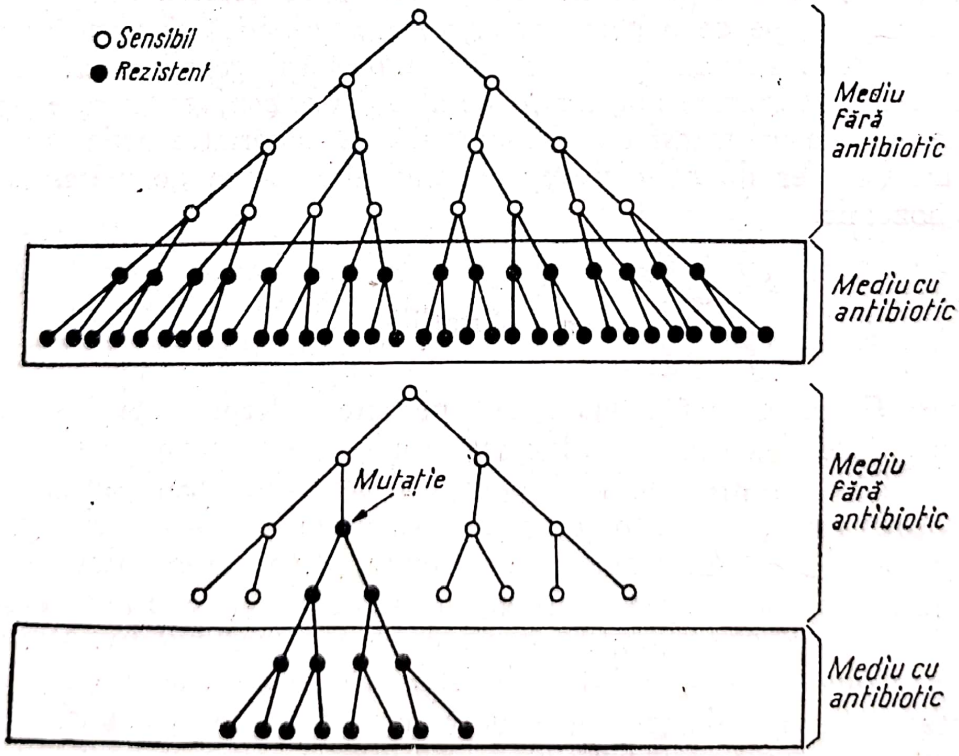


Fig. 319. Mecanismul de apariţie a rezistenţei la antibiotice. Rezistenţa nu este datorită adaptării la prezenţa antibioticului în mediu (*sus*) ci se instalează prin mutaţie. Celulele mutante se replică în medie cu antibiotice păstrînd acest caracter, în timp ce celulele sensibile dispar (după Watanabe).

perechi bazele complementare adenină şi timină *(A-T)*, pe de o parte, şi citozină şi guanină *(C-G)*, pe de altă parte, poate fi alterată datorită modificării structurale a unei baze, care, de aceea, în loc să atragă baza complementară (mai exact nucleotidul care o conţine), atrage o bază „rea", nepotrivită, ceea ce alterează mesajul genetic normal. Ordinea „greşită" din acest mesaj se va perpetua în cursul replicării ulterioare, teoretic în mod indefinit, deşi mutaţia nu este de fapt absolut ireversibilă, şi aceasta va avea ca urmare schimbarea secvenţei aminoacizilor în proteina codificată de segmentul de material genetic modificat prin mutaţie.

Clasificarea mutaţiilor poate fi făcută după mai multe criterii care nu se exclud reciproc.

— În funcţie de modul lor de apariţie există două feluri de mutaţii:

1) *mutaţii spontane*, care apar în natură datorită unor *cauze necunoscute*, în condiţii de mediu obişnuite şi fără intervenţia vreunui factor decelabil;

2) *mutaţii induse*, care se produc sub acţiunea unor factori de mediu funcţionînd ca *agenţi mutageni*, în sensul că măresc ritmul sau rata de apariţie a unor mutaţii care oricum s-ar fi produs şi spontan, dar la intervale mai mari de timp.

— În raport cu mărimea segmentului genetic alterat, mutaţiile pot fi, de asemenea, de două tipuri:

1) *mutaţii punctiforme*, care corespund alterării unui singur nucleotid, acesta constituind din punct de vedere chimic cea mai mică unitate structurală de construcţie a materialului genetic, sau modificării unui singur codon, cea mai mică unitate funcţională de mesaj genetic;

2) *mutaţii „extinse"*, care reprezintă o alterare depăşind limitele unui codon, şi putînd afecta o genă alcătuită din mai mulţi codoni *(mutaţie genică)* sau chiar, uneori, mai multe gene *(mutaţie poligenică)*.

— După sensul modificării în raport cu mesajul genetic iniţial, mutaţiile pot fi iarăşi de două feluri:

1) *mutaţii „înainte"* *(„foreword" mutations)*, care schimbă mesajul genetic caracteristic tipului sălbatic originar, fapt care la tipul mutant derivat se traduce, spre exemplu, prin incapacitatea lui de a mai face sinteza unei enzime funcţionale, deci prin pierderea unei anumite funcţii metabolice esenţiale, de unde caracterul lui de *mutantă auxotrofă* (care are nevoie să i se furnizeze metabolitul pe care singur nu-l mai poate sintetiza);

2) *mutaţiile „înapoi"*, *retromutaţiile* sau *mutaţiile inverse* ori *contrare* *(„back" mutations* sau *reverse mutations)*, care corespund unei schimbări de mesaj genetic afectînd de astă dată o mutantă, ceea ce determină revenirea acesteia la tipul sălbatic iniţial; astfel, o tulpină bacteriană devenită auxotrofă, ca urmare a unei mutaţii anterioare, se poate reîntoarce la condiţia prototrofă originară printr-o nouă mutaţie, restabilind acum capacitatea de sinteză care fusese pierdută pe cale de mutaţie.

— În raport cu exprimarea lor fenotipică, mutaţiile pot fi de trei tipuri:

1) *perceptibile*, manifestîndu-se prin schimbări de diferite grade ale unor caractere fenotipice;

2) *imperceptibile*, în cazul în care caracterul genotipic mutant nu se exprimă fenotipic;

3) *letale*, în care alterarea mesajului genetic are un efect mortal pentru organismul afectat de mutaţie.

Rata de apariţie şi frecvenţa mutaţiilor

Selecţia corectă a nucleotidelor în cursul replicării ADN este un proces care se realizează în genere cu o foarte mare exactitate, astfel încît probabilitatea medie de eroare — constînd din inserţia unui nucleotid inadecvat — este, în mod normal, foarte mică.

Rata mutaţiei, reprezentînd probabilitatea medie ca o bacterie să sufere o mutaţie într-o unitate definită de timp, în mod obişnuit egală cu timpul de generaţie, este de 1.10^{-9}. Aceasta înseamnă că atunci cînd totalul indivizilor dintr-o generaţie rezultată din diviziune este de 10^9 celule, în medie unul dintre aceşti descendenţi este mutant (Novick şi Szilard). Ca urmare, atîta timp cît clona — populaţia bacteriană derivată dintr-o singură celulă — este mică, analiza indivizilor care o compun arată că ei sînt identici, astfel încît clona este omogenă din punct de vedere genetic. Cînd numărul indivizilor se măreşte, populaţia bacteriană devine genetic eterogenă datorită prezenţei uneia sau mai multor celule mutante. Mai mult decît atît, într-una şi aceeaşi populaţie se pot acumula mutaţii succesive. Astfel, spre exemplu, o populaţie cu caracterele originare *P* (prototrof), S^s (sensibil la streptomicină) şi F^s (sensibil la fag) poate deveni în ultima instanţă purtătoare a caracterelor mutante *A* (auxotrof), S^r (rezistent), F^r (rezistent la fag). În cazul în care, tocmai datorită mutaţiei suferite, celulele mutante sînt mai bine adaptate la condiţiile mediului existent decît cele parentale, ele se multiplică mai rapid decît acestea şi, ca urmare, descendenţii lor vor creşte numeric în raport cu populaţia parentală, iar complexitatea genotipică şi fenotipică a întregii populaţii se va amplifica.

Frecvenţa mutantelor este un indice a cărui valoare se obţine raportînd numărul de celule mutante prezente într-un anumit moment, la numărul total al celulelor din populaţia bacteriană respectivă. Valoarea acestui indice depinde, pe de o parte, de rata mutaţiei şi de momentul în care se face evaluarea lui, iar pe de altă parte, de acţiunea favorizantă sau defavorizantă exercitată asupra multiplicării mutantelor de către acei factori de mediu în raport cu care mutaţia dată reprezintă pentru celule un avantaj sau, dimpotrivă, un dezavantaj selectiv în comparaţie cu condiţia normală a indivizilor care alcătuiesc populaţia celulară originară.

Argumente pentru caracterul spontan al mutaţiilor

Dificultatea în a demonstra caracterul *spontan* al mutaţiei la bacterii decurge din faptul că, datorită numărului lor foarte mic în raport cu populaţia bacteriană normală, sălbatică, celulele mutante nu pot fi evidenţiate cu uşurinţă decît în prezenţa agentului selectiv. Astfel, rarele mutante rezistente la

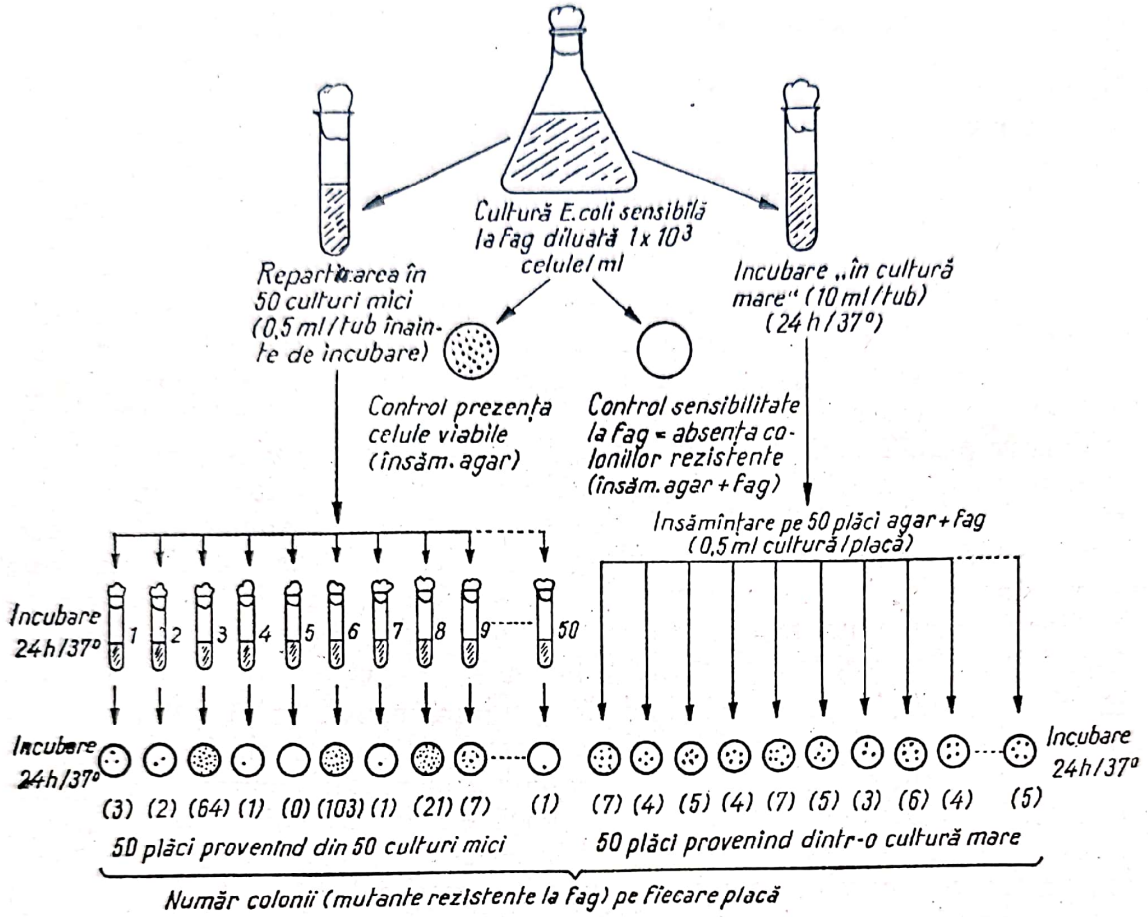


Fig. 320. Demonstrarea caracterului spontan al mutaţiilor cu ajutorul testului „fluctuaţiei" al lui Luria şi Delbrück.

streptomicină (S^r), aflate într-o populaţie predominant-sensibilă (S^s), pot fi puse în evidenţă numai pe medii care conţin antibioticul respectiv, mutantele rezistente la fag se evidenţiază în prezenţa bacteriofagului ş.a.m.d. În absenţa acestor factori de selecţie, modificările individuale rămîn nedetectate atîta timp cît n-au devenit prevalente, deci nu se manifestă ca modificări ale populaţiei bacteriene respective.

Prima demonstraţie experimentală a caracterului spontan al mutaţiilor a fost adusă prin *testul fluctuaţiei* imaginat de Luria şi Delbrück (1943). În acest test se foloseşte o cultură tînără de *E. coli* diluată în bulion şi împărţită în două porţiuni a cîte 10 ml fiecare — *A* şi *B* — conţinînd aproximativ acelaşi număr de bacterii, adică circa 1 000 de celule. Suspensia *A* este incubată ca atare sub formă de „cultură mare", un anumit interval de timp, după care este etalată, în porţiuni de cîte 0,2 ml, pe suprafaţa a 50 de plăci Petri conţinînd un mediu cu geloză şi o suspensie de fag omolog. Suspensia *B* este de la început distribuită, cîte 0,2 ml, în 50 de eprubete mici, obţinîndu-se astfel „culturile mici" al căror conţinut, după aceeaşi perioadă de incubaţie ca şi în cazul suspensiei *A*, este etalat de asemenea pe cîte o placă Petri cu

mediu gelozat şi cu suspensie de fag. La sfîrşitul perioadei de incubaţie a culturilor din toate plăcile, se constată că numărul mutantelor rezistente la fag, obţinute pornind de la „cultura mare" (*A*) variază în limite foarte mici, de 3—7 mutante pe o placă, variaţie care corespunde erorii obişnuite în condiţiile acestei tehnici. Dimpotrivă, în cazul plăcilor însămînţate cu cele 50 „culturi mici" (*B*), numărul mutantelor prezintă fluctuaţii foarte mari, cuprinse între 0 şi 103 colonii rezistente la fag pe o placă.

Pornind de la premisa că la începutul experienţei toate celulele bacteriene erau asemănătoare ca sensibilitate la fagul omolog, dacă mutaţia în sensul rezistenţei la fag ar fi apărut în urma contactului cu acest agent, adică după etalarea pe plăci, ar fi trebuit ca numărul coloniilor de bacterii fagorezistente dezvoltate pe fiecare dintre plăcile însămînţate cu „culturi mici" (*B*) să fie aproximativ egal. Numărul foarte variabil de mutante, cuprins între 0 şi 103 colonii rezistente arată însă că mutantele apăruseră anterior contactului cu fagul în timpul incubării celor 50 de „culturi mici", şi anume în momente foarte diferite de la cultură la cultură (numărul mic de colonii rezistente corespunzînd culturilor în care mutantele au apărut tardiv, iar numărul mare culturilor în care mutantele au apărut precoce şi de aceea au avut timpul să se înmulţească înainte de etalarea în plăci).

Pe plăcile însămînţate cu porţiuni din „cultura mare" unică (*A*) nu se observă aceste fluctuaţii ale numărului de mutante. Pe toate plăcile din această categorie, numărul coloniilor fagorezistente este mare dacă mutaţiile au apărut mai precoce în cultura în tub, sau mic dacă ele au survenit tardiv, dar totdeauna acest număr este relativ egal de la placă la placă, deoarece însămînţarea s-a făcut cu cantităţi egale dintr-una şi aceeaşi cultură.

Probe experimentale similare privind caracterul spontan al mutaţiilor au mai fost aduse ulterior şi prin *testul dispersiei* al lui Newcombe (1949), *testul culturii prin replică* (*„replica plating"*) a lui Lederberg (1952) ş. a.

Bazele moleculare ale mutagenezei

Numeroase studii experimentale ale mutaţiilor punctiforme au demonstrat că, la nivel molecular, alterările mutaţionale localizate ale materialului genetic constau din modificări ale secvenţei bazelor survenite în regiuni limitate ale moleculei de ADN cu ocazia „copierii" acesteia în cursul replicării. Aceste modificări nu împiedică însă replicarea ADN, dar au ca efect schimbarea mesajului genetic purtat de el şi transmis la descendenţi, schimbare care constă în pierderea sau alterarea funcţiei exercitate de gena implicată, cu repercusiuni asupra exprimării caracterului fenotipic determinat de ea.

Există patru tipuri principale de modificări mutaţionale afectînd reproducerea secvenţei de baze a ADN: *substituţia, deleţia, inserţia* şi *inversarea*.

Substituţia sau înlocuirea cu o altă bază a unei anumite baze prescrise în secvenţa nucleotidică dată implică două tipuri de erori: *a*) *tranziţia*, constînd din substituirea unei pirimidine cu altă pirimidină sau a unei purine cu o altă purină, şi *b*) *transversia*, reprezentînd înlocuirea unei pirimidine cu o purină sau a unei purine cu o pirimidină. Înlocuirea prin transversie se pro-

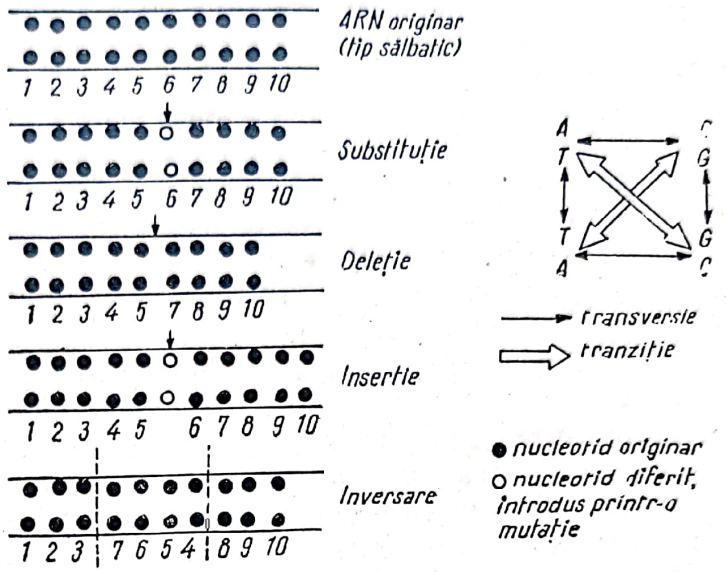


Fig. 321. Mecanismul biochimic al mutaţiilor. În dreapta sînt reprezentate modificările realizate prin *tranziţie* sau *transversie* în cazul mutaţiilor prin substituţie.

duce probabil în cursul a două replicări consecutive. Spre exemplu, o bază purinică *G* s-ar lega mai întîi greşit cu o altă bază purinică *A*, iar ulterior *A* ar lega baza pirimidinică *T* în locul bazei *G*, ceea ce ar determina în secvenţa respectivă transversia *G—T*.

Deleţia sau *suprimarea* corespunde omiterii unei baze la formarea uneia dintre secvenţele nucleotidice.

Inserţia sau *adiţia* reprezintă adăugarea unei baze suplimentare faţă de secvenţa originară.

Inversarea constă în aceea că un număr de baze dintr-un mic segment al catenei de ADN îşi schimbă ordinea în cursul „copierii", dispunîndu-se într-o succesiune inversă faţă de cea originară.

În toate aceste cazuri, „copierea greşită" are loc de obicei mai întîi într-o singură catenă, schimbarea corespunzătoare a catenei complementare producîndu-se în cursul replicării moleculei care are deja o catenă „greşită". Cînd gena a suferit o mutaţie limitată, aşa cum este mutaţia punctiformă, ea nu este pierdută din zestrea genetică a celulei, întrucît nu este distrusă, ci este numai transformată, cu păstrarea capacităţii de revenire la forma originară, mutaţia suferită putînd fi reversibilă. Gena se transformă deci prin mutaţie într-o *alelă*, adică într-o genă similară, care păstrîndu-şi în esenţă structura caracteristică iniţială, a suferit numai o modificare structurală de detaliu, ceea ce antrenează schimbarea activităţii ei funcţionale de unde, în consecinţă, o anumită repercusiune asupra metabolismului celular [1]. Spre exemplu, gena care poartă markerul S^s şi cea care poartă markerul S^r (caracterele de sensibilitate şi respectiv de rezistenţă la streptomicină) nu sînt decît două alele ale aceleiaşi gene, răspunzătoare de comportarea celulei în prezenţa streptomicinei.

[1] Pentru a ilustra modificările survenite prin mutaţie se poate recurge la analogia cu limbajul: mesajul genetic originar reprezentat prin cuvîntul *solar* ar putea deveni *polar* (substituţie), *solr* (deleţie), *sovlar* (inserţie) sau *salor* (inversare).

Revenirea la tipul sălbatic se poate face printr-o aşa-numită *reversie*, frecventă mai ales în cazul modificărilor punctiforme, dar este practic imposibilă în cazul mutaţiilor prin deleţii masive, care afectează zeci şi sute de nucleotide.

Mutantele de reversie apar pe două căi: *1) prin retromutaţie* sau mutaţie de *reversie* propriu-zisă, care constă din repararea alterării mutaţionale printr-o nouă modificare produsă în acelaşi loc de pe secvenţa de baze, adică chiar acolo unde a survenit alterarea iniţială; *2) printr-o mutaţie localizată într-o altă regiune nucleotidică*, situată la distanţă de regiunea alterată iniţial. În acest ultim caz, cea de-a doua mutaţie are un *efect supresor*, anulînd efectul primei mutaţii. Asemenea mutaţii cu caracter supresor, graţie cărora se restabileşte citirea exactă a mesajului genetic alterat, sînt însă doar aparent retromutaţii, deoarece mutantele rezultate pe această cale seamănă numai fenotipic cu celulele parentale, în timp ce genotipic ele rămîn mai departe diferite de acestea, genomul lor suferind, de fapt, o mutaţie adiţională.

Unitatea de mutaţie. Studiul genetic al mutantelor individuale selecţionate dintr-o populaţie bacteriană a arătat că, în genere, o mutantă rezultă din lezarea unor entităţi distincte şi separate din genomul total reprezentînd „porţiuni" *(bits)* de informaţie. Astfel, în cazul unui organism cu genotipul normal *ABCDEFG*, o mutaţie spontană poate duce la *AbCDEFG*, alta la *ABCdEFG* ş.a.m.d. Aceasta demonstrează că mutaţiile pot apărea prin alterarea independentă a unor determinanţi genetici diferiţi reprezentînd părţi mici din informaţia genetică totală. Unitatea de mutaţie sau *mutonul* (Benzer) este o subregiune genetică distinctă, corespunzînd cele mai mici părţi din genomul total a cărei modificare se traduce printr-o mutaţie punctiformă. Această regiune minimă, susceptibilă de mutaţie, este echivalentă din punct de vedere chimic cu un nucleotid, ceea ce corespunde din punct de vedere funcţional unui *codon*, adică unităţii de mesaj genetic a cărei semnificaţie poate fi alterată prin mutaţie.

Exemple de mutaţii la bacterii

Mutaţii care afectează morfologia celulei. Prezenţa formaţiunilor anatomice accesorii ale bacteriilor (flageli, pili, spor, capsulă) este controlată genetic şi, ca urmare, unele mutaţii pot avea ca rezultat pierderea acestor formaţiuni structurale. Astfel, sinteza flagelilor, care este controlată prin activitatea mai multor gene, poate fi oprită în urma alterării prin mutaţie a genelor corespunzătoare, ceea ce duce la apariţia unor celule aciliate, imobile. În mod similar, bacteriile piliate (P^+) îşi pot pierde pilii, iar din bacteriile sporulate pot deriva mutante asporogene. În acest ultim caz, însă, mutaţia nu pare a fi legată de pierderea informaţiei genetice necesară pentru sporulare, ci de „reprimarea" traducerii ei în activitatea metabolică respectivă, probabil în urma inserării în genom a unui fragment de material genetic care aduce un supliment de informaţie cu semnificaţie represivă. Tulpinile bacteriene capsulate pot avea variante necapsulate, ca rezultat al pierderii prin mutaţie a capacităţii de elaborare a enzimelor care dirijează biosinteza componenţilor capsulari.

Mutaţii care afectează morfologia coloniilor. Apartenenţa coloniilor bacteriene la un anumit tip morfologic este determinată în mare măsură de însăşi

morfologia şi structura de suprafaţă a celulelor, caractere care sînt determinate genetic. Într-adevăr, forma coloniei este dată de aranjarea între ele, pe medii solide, a celulelor-fiice rezultate din diviziune, celule care — în funcţie de anumite caracteristici structurale de suprafaţă — pot să rămînă izolate, îngrămădindu-se numai unele lîngă altele pentru a forma colonia de tip „*S*", sau se pot dispune cap la cap în filamente lungi, întortocheate, îndoite la punctele de legătură dintre celule, în cazul coloniei de tip „*R*".

Schimbările de morfologie colonială, de tip „*S*", „*R*" şi „*M*" etc., reflectă în ultimă instanţă *mutaţii biochimice* legate de modificări în ceea ce priveşte prezenţa sau activitatea enzimelor care controlează direct sau indirect sinteza unui anumit component de suprafaţă al celulei. Mutaţiile care afectează morfologia coloniei sînt corelate şi cu modificări ale altor caractere ale celulei normale. Spre exemplu, la celulele de pneumococ care au suferit mutaţia „*S*"→„*R*", modificarea tipului colonial este corelată cu pierderea polizaharidului capsular, care are funcţie antigenică şi este implicat în virulenţă, de unde caracterul de *mutante antigenice* şi, o dată cu aceasta, de *mutante avirulente* al pneumococilor necapsulaţi.

În general, mutantele avirulente apar în urma pierderii unora dintre atributele celulei bacteriene care-i asigură puterea de invazie, cum ar fi capacitatea de sinteză a hialuronidazei, agresinelor etc., sau rezistenţa la acţiunea forţelor de apărare ale organismului-gazdă, aşa cum sînt prezenţa capsulei, a unor antigene de suprafaţă etc.

Mutaţii care afectează proprietăţile biochimice ale celulei. Sub denumirea de „mutante biochimice" sînt reunite — în mod convenţional, deoarece, de fapt, orice mutaţie este de natură biochimică, toate tulpinile microbiene care au pierdut sau au cîştigat anumite particularităţi de nutriţie sau care prezintă modificări uşor de recunoscut ale unor procese enzimatice. Se consideră, de asemenea convenţional, că forma normală a unei tulpini de microorganisme întîlnită în mod obişnuit în natură corespunde tipului său sălbatic reprezentînd forma *prototrofă*. La multe specii microbiene, tipurile sălbatice cresc şi pe medii minimale — medii de cultură foarte simple care nu conţin factori de creştere — deoarece tulpinile prototrofe dispun de întregul echipament enzimatic necesar pentru a-şi sintetiza constituenţii celulari pornind de la precursori cu structură chimică mai simplă. Din tipul sălbatic sau prototrof pot însă deriva mutante cu anumite incapacităţi de sinteză, aşa-numitele *mutante auxotrofe* care nu cresc pe mediile minimale decît dacă acestea sînt suplimentate cu factorul de creştere pe care, în urma unei mutaţii, celula nu-l mai poate sintetiza.

Exigenţele tulpinilor microbiene în ceea ce priveşte prezenţa obligatorie în mediu a anumitor factori de creştere reprezintă markeri genetici sau caractere marcante ale tulpinilor respective şi sînt folosite în studiile de genetică microbiană pentru analiza acţiunii specifice a genelor, pentru studiul mecanismelor de control genetic al activităţilor celulare etc. Utilizarea mutantelor auxotrofe a permis, de asemenea, studiul căilor naturale de biosinteză a aminoacizilor şi vitaminelor. De asemenea, aceste mutante sînt folosite curent pentru identificarea şi dozarea unor aminoacizi şi vitamine.

Scanned with OKEN Scanner

Mutaţii care afectează pigmentogeneza. Spre deosebire de modificările pigmentare cu caracter de variaţii fiziologice, care afectează de obicei pe toţi membrii unei populaţii bacteriene şi durează numai atîta timp cît mediul de cultură este modificat ca temperatură, *p*H etc., alterările mutaţionale ale pigmentogenezei reprezintă variaţii genetice individuale cu caracter stabil. Ele afectează deci numai cîteva celule dintr-o populaţie parentală normală; de exemplu, la *S. marcescens* rata foarte joasă a acestui tip de mutaţie este de 1.10^{-3}—1.10^{-7}.

Mutaţiile virusurilor. Caracteristic pentru mutageneza virală este faptul că alterările mutaţionale se produc numai în cursul fazei de replicare — de multiplicare intracelulară a virusului — şi niciodată în faza de virion matur extracelular. La virusurile animalelor, ca şi la cele ale plantelor, mutaţiile afectează în special virulenţa şi termorezistenţa, iar la fag ele privesc mai ales natura plajelor (mărimea, transparenţa şi morfologia lor). O categorie importantă de mutante virale este aceea a mutantelor *defective*, care sînt caracterizate prin incapacitatea lor de a trece în forma de virus matur, după încheierea procesului de replicare propriu-zisă.

Cauzele mutaţiei spontane

Deşi pînă în prezent numeroşi factori naturali ca temperatura, razele UV, razele cosmice, radioactivitatea unor substanţe etc. au fost incriminaţi ca avînd un rol în apariţia mutaţiilor spontane, nici unul dintre ei nu poate fi de fapt considerat ca un agent determinant în acest sens. Plecînd de la datele cunoscute asupra mecanismelor moleculare ale mutaţiilor induse, date care arată că nici o mutaţie nu se produce fără cauză, Zamenhof interpretează caracterul „spontan" al mutaţiilor ca rezultînd din faptul că factorii lor determinanţi reali sînt omniprezenţi în natură şi necunoscuţi.

Acţiunea agenţilor mutageni

Numeroşi agenţi fizici, chimici şi biologici au proprietatea de a mări de 10—100 000 de ori rata de apariţie a mutaţiilor. Acţiunea lor se poate exercita în special pe trei căi: *1)* inducerea unor erori de replicare a ADN în sensul încorporării altor nucleotide decît cele normale în molecula în curs de constituire; *2)* acţiunea directă asupra ADN sau a precursorilor necesari pentru sinteza lui, acţiune exercitată, de exemplu, prin alterarea chimică a bazelor (care poate surveni chiar şi după încorporarea lor în molecula ADN) urmată apoi de legarea unor baze diferite de cele normale în cursul replicărilor ulterioare; *3)* acţiunea asupra unor sisteme metabolice corelate cu sinteza ADN.

Natura şi sensul mutaţiilor produse pe aceste căi, *mutaţii induse*, sînt imprevizibile şi, ca atare, nedirecţionate de mediu. Mutaţiile induse reprezintă, de fapt, mutaţii care s-ar fi produs şi în mod spontan, adică fără intervenţia unor agenţi mutageni, dar într-un ritm mult mai lent.

Acţiunea mutagenă a analogilor bazelor. Analogii bazelor nucleice sînt substanţe care au o structură chimică similară aceleia a bazelor normale şi

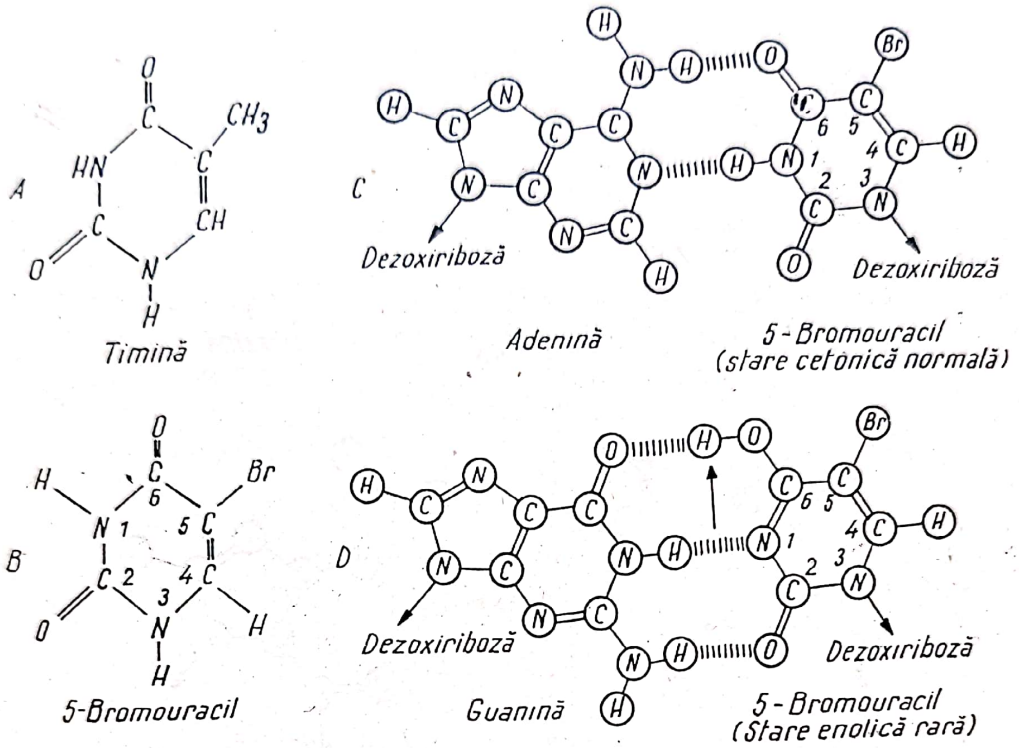


Fig. 322. Mecanismul mutagenezei prin analogi ai bazelor:
A — Timina; *B* — 5-Bromouracil (5-B.U.); *C* — legarea normală, cu adenina, a 5-B.U. în forma sa obişnuită, cetonică; *D* — legarea anormală cu guanina a 5-B.U. cu forma sa rară, enolică. Săgeata indică deplasarea unui proton în tautomerizarea 5-B.U.

care, de aceea, pot fi încorporate în locul acestora în molecula de ADN, ca urmare a unor erori în procesele de replicare, această încorporare eronată perpetuîndu-se apoi în cursul replicărilor ulterioare. Astfel *5-bromouracilul* (*5-BU*), analog al timinei, este încorporat în ADN bacterian şi fagic, unde înlocuieşte practic toată *T* în cazul cînd mediul de cultură conţine cu precădere acest analog şi numai cantităţi mici de *T*. El se leagă în mod obişnuit de *A* astfel încît, pornind de la perechea de baze *T—A* se ajunge la perechea *5-BU—A*. Dar, datorită electronegativităţii crescute a moleculei, *5-BU* se poate lega cu *G* (care în mod normal se leagă de *C*), astfel că, din timp în timp, în locul perechii *5-BU—A* va apărea perechea *5-BU—G*. În generaţia următoare se vor forma perechile *5-BU—A* şi *C—G*. În felul acesta, în locul perechii de baze *5-BU—A* (respectiv *T—A* iniţial) apare pînă la urmă perechea *C—G*, ceea ce reprezintă o eroare permanentă de replicare, de tip mutaţie punctiformă.

Acţiunea mutagenă a acidului nitros. Acidul nitros (HNO_2) acţionează direct asupra ADN printr-un proces de dezaminare a bazelor nucleice, constînd din înlocuirea grupărilor NH_2 cu grupări OH, ceea ce reprezintă o alterare directă a codului prin convertirea unei baze în alta. În acest proces, *A* este dezaminată la hipoxantină (*H*), *G* la xantină (*X*), iar citozina la uracil (*U*). În replicările ulterioare, *H* (analog al *G*) se leagă cu *C*, astfel încît perechea normală de baze *A—T* suferă modificări succesive *H—T→H—C→G—C*.

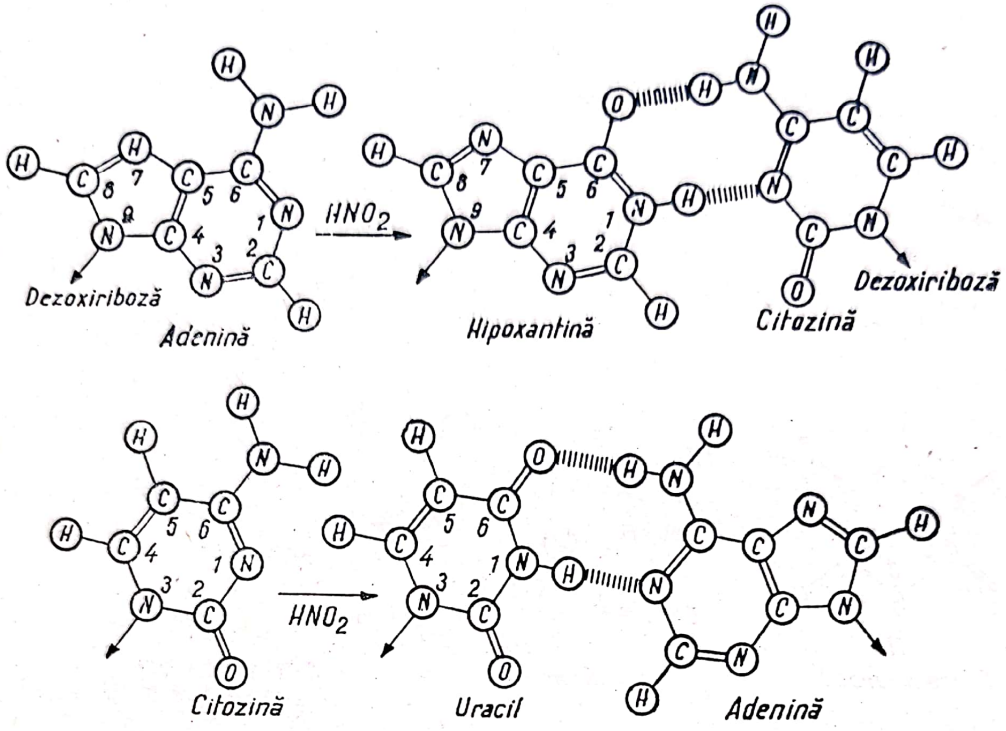


Fig. 323. Mecanismul dezaminării oxidative a ADN sub acţiunea acidului nitros şi urmările sale asupra împerecherii ulterioare a bazelor. *Sus: A* este dezaminată la hipoxantină care se leagă cu *C* în loc de *T*; *jos: C* este dezaminată la *U* care se leagă cu *A* în loc de *G*.

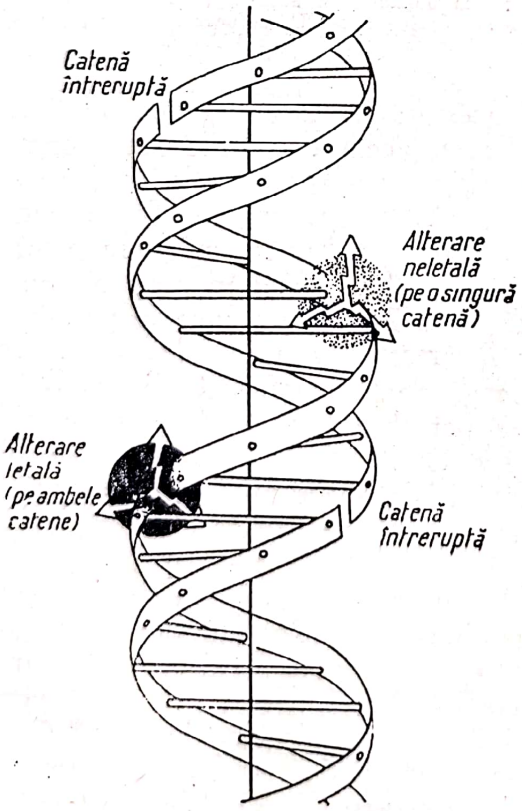


Fig. 324. Efectul diferenţiat al încorporării P^{32} în molecula de ADN. Alterările neletale se datoresc unei degradări limitate, urmată de ruperea uneia dintre catene, iar cele letale sînt consecinţa ruperii ambelor catene de ADN (după Stent).

Coloranţii de acridină îşi exercită acţiunea mutagenă inserîndu-se pe una din catenele moleculei ADN între două baze adiacente. Astfel, ei produc probabil o discontinuitate a lanţului, urmată de adiţii sau deleţii de baze care determină alterarea mesajului genetic înscris în secvenţa nucleotidică respectivă.

Efectul mutagen al temperaturilor ridicate (peste 60°C) este datorat unui proces de depurinizare a ADN. „Locurile apurinice" din moleculă se pot împerechea apoi cu oricare dintre baze, ceea ce duce în cursul replicărilor următoare la modificări de tipul *tranziţiilor* sau *transversiilor*.

Efectul mutagen al P^{32} se exercită prin ruperea lanţului ADN la nivelul încorporării P^{32}, urmată de apariţia unor deleţii în structura secvenţei nucleotidice corespunzătoare.

Semnificaţia biologică a variabilităţii microorganismelor

Cercetările de genetică a microorganismelor demonstrează clar faptul că stabilitatea materialului genetic nu este absolută, el fiind apt, într-o anumită măsură, să sufere diverse modificări structurale. Dacă informaţia genetică ar fi imuabilă, în sensul că ea ar dirija întotdeauna formarea unui sistem biologic absolut identic, orice modificare bruscă a mediului care condiţionează echilibrul acestui sistem ar fi dăunătoare, mergînd chiar pînă la a antrena dezagregarea lui. Astfel, acţiunea unui antibiotic ar putea determina chiar dispariţia speciei microbiene sensibile, dacă informaţia genetică de care depinde sensibilitatea celulei la acel antibiotic nu ar putea fi alterată brusc, în sensul instaurării rezistenţei celulei la antibioticul respectiv. Prin urmare, lipsa unei stabilităţi absolute în ceea ce priveşte replicarea materialului genetic care deţine informaţia transmisă de la o generaţie la alta este beneficială pentru supravieţuirea speciei, iar apariţia unui genotip modificat prin mutaţie sau prin recombinare poate conferi organismului posibilităţi mai bune de adaptare la condiţii de mediu noi.

b. Mecanismele de transfer genetic la bacterii

Capacitatea bacteriilor, ca şi a altor organisme, de a supravieţui şi de a se multiplica în condiţii de viaţă defavorabile este condiţionată de limitele posibilităţilor lor de adaptare, adică de potenţialul lor genotipic de reacţie. Acest potenţial controlat genetic se poate modifica nu numai prin mutaţie, adică prin modificarea structurală a materialului genetic dat, ci şi printr-un transfer de material genetic exogen, susceptibil de a fi încorporat în genomul receptor.

S-au descris patru mecanisme de transfer genetic — *transformarea, transducţia, conjugarea* şi *sexducţia*, care, deşi mai puţin complexe decît procesele sexuale ale unor organisme superioare, permit totuşi amestecarea şi reasortarea informaţiei genetice provenite de la două organisme foarte înrudite ca înzestrare genetică, exceptînd numai uşoare diferenţe genotipice. În felul acesta rezultă un număr mare de variaţii genetice asupra cărora acţionează selecţia şi care, pe această cale, joacă un rol deosebit de important în evoluţia speciilor.

Procesele de transfer genetic la bacterii au două particularităţi fundamentale:

1) *Lipsa unei fuziuni veritabile a celulelor şi a nucleilor,* în cursul acestor procese realizîndu-se numai o trecere unidirecţională a fragmentului de material genetic de la celula donatoare la cea receptoare; porţiunea de material genetic provenită de la donor este numită *exogenot,* iar echipamentul genetic al receptorului poartă denumirea de *endogenot.*

2) *Contribuţia inegală a celor două celule parentale la formarea zigotului* care, tocmai de aceea, nu este un zigot tipic, ci un merozigot reprezentat în întregime de celula receptoare care a devenit temporar şi parţial diploidă, dar numai în ce priveşte acea parte a materialului său genetic care este omologă fragmentului exogen primit de la donor.

În unele cazuri, o dată transferul desăvîrşit, exogenotul, a cărui prezenţă conferă celulei receptoare caracterul de merozigot, se substituie prin recombinare genetică porţiunii omologe din endogenot, ceea ce are ca rezultat restabilirea stării de haploidie a celulei. Aceasta poartă acum un cromozom recombinant a cărui informaţie genetică este parţial înlocuită de aceea purtată de fragmentul de genom transferat şi integrat prin recombinare. În cazul în care informaţia depozitată în acest fragment exogen corespunde unui caracter nou care se exprimă fenotipic, prezenţa celulelor recombinante poate fi decelată experimental prin dispersia suspensiei bacteriene pe suprafaţa unui mediu de cultură selectiv, care permite numai dezvoltarea recombinanţilor. Un asemenea caracter nou poartă numele de *„marker"* genetic sau caracter *marcant,* deoarece reprezintă criteriul de identificare a formelor noi rezultate din recombinare.

Caracterele noi cu rol de „marker" genetic folosite în studiile de genetică sînt reprezentate, spre exemplu, de sensibilitatea sau rezistenţa la un bacteriofag sau la un anumit antibiotic, creşterea condiţionată de prezenţa unei anumite substanţe (aminoacid, vitamină) în mediul de cultură, degradarea unui anumit zahăr etc.

Transformarea

Transformarea este *transferul de informaţie genetică* realizat prin intermediul unei fracţiuni din ADN total al celulei donor eliberat prin extracţie chimică sau prin liza celulei. O dată pătruns într-o celulă bacteriană receptoare, fragmentul de ADN exogen poate înlocui, printr-un proces de recombinare genetică, o secvenţă nucleotidică omologă din genomul receptorului. Dacă segmentul astfel integrat diferă de cel înlocuit, celula receptoare va dobîndi o proprietate nouă, controlată de secvenţa nucleotidică exogenă încorporată în genomul ei.

Descrisă iniţial la pneumococ (*Diplococcus pneumoniae*) transformarea a fost apoi pusă în evidenţă şi la bacterii din genurile *Streptococcus, Haemophilus, Neisseria, Bacillus* şi *Rhizobium.* Posibilitatea realizării ei pare a se datora unei stări de „competenţă" a celulei receptoare, competenţă care ţine de doi factori: unul permiţînd pătrunderea moleculei de ADN transformant în celula receptoare, iar al doilea condiţionînd capacitatea exogenotului ajuns în celula receptoare de a se recombina cu endogenotul.

Scanned with OKEN Scanner

Prin procesul de transformare, anumite tulpini bacteriene crescute în prezenţa unor celule omorîte şi lizate, a unor filtrate de cultură sau a unor extracte de ADN provenind de la tulpini înrudite pot, prin urmare, să capete şi să manifeste în generaţiile următoare anumite proprietăţi noi caracteristice tulpinii donatoare de ADN transformant.

Fenomenul a fost descoperit în 1928 de Griffith la pneumococ, specie care poate fi subîmpărţită în circa 100 de tipuri distincte pe baza compoziţiei chimice şi a specificităţii serologice a polizaharizilor capsulari. Spre exemplu, polizaharizii capsulari de tip III sînt polimeri de glucoză şi acid glucuronic, iar cei de tip II polimeri de acid galacturonic, galactoză, N-acetil-glucozamină şi fucoză. Formarea lor necesită prezenţa şi intervenţia unor enzime (polimeraze) adecvate şi, în consecinţă, a unui echipament genetic corespunzător, capabil să determine sinteza acestor enzime. De prezenţa capsulei polizaharidice, capabilă să protejeze bacteria de fagocitoză, depinde virulenţa diferită a tipurilor de pneumococ.

Griffith a observat că uneori, cînd sînt inoculate în doze mari, chiar bacteriile necapsulate, deci avirulente, pot produce infecţii mortale la şoarece, de la care se izolează însă bacterii capsulate, virulente. El a presupus că bacteriile avirulente nu-şi pierduseră complet capacitatea de sinteză a polizaharidului capsular şi că prin inocularea unui număr mare de bacterii s-ar introduce o cantitate suficient de ridicată de polizaharid pentru ca, într-un mod necunoscut, capacitatea normală de sinteză a capsulei să se restabilească la aceste bacterii. Conform ipotezei sale, tulpinile necapsulate şi-ar putea recăpăta astfel virulenţa în contact cu polizaharidul capsular. Pentru a-şi verifica experimental ipoteza, Griffith a inoculat pe cale subcutanată la şoareci un amestec alcătuit dintr-un număr mic de bacterii vii avirulente (bacterii necapsulate de tipul serologic II) şi o cantitate mare de bacterii virulente(capsulate, de tip III) omorîte prin căldură. Inoculate separat, nici una dintre cele două componente ale amestecului nu sînt infectante. Asociate însă, ele omoară şoarecii prin septicemie, din sîngele animalelor infectate izolîndu-se pneumococi capsulaţi de tip III. Cu acelaşi sistem, transformarea a fost ulterior demonstrată şi *in vitro* (Dawson şi Sia, 1931), precum şi în prezenţa unor extracte acelulare de pneumococ virulent capsulat de tip III.

Natura agentului transformant care opera în experienţele lui Griffith a fost demonstrată însă abia în 1944 de Avery şi col., care au arătat că el constă dintr-un fragment de ADN pur, cu grad înalt de polimerizare. Capacitatea acestui ADN de a pătrunde în celulele competente ţine de structura sa dublu helicală şi de o greutate moleculară critică de 10^6—10^7. Cantitatea de ADN implicată în procesul de transformare este deci relativ mică, deoarece o greutate moleculară de 10^7 echivalează cu aceea a unui fragment cromozomic constituit din circa 20 de gene, ceea ce reprezintă aproximativ 1/10 din lungimea cromozomului bacterian întreg. Deşi ADN este foarte activ ca agent transformant, numai 1% din celulele competente suferă efectiv transformarea, deoarece fragmentul liniar de ADN exogen este expus acţiunii de degradare a dezoxiribonucleazei din celula receptoare, astfel încît recombi-

Scanned with OKEN Scanner

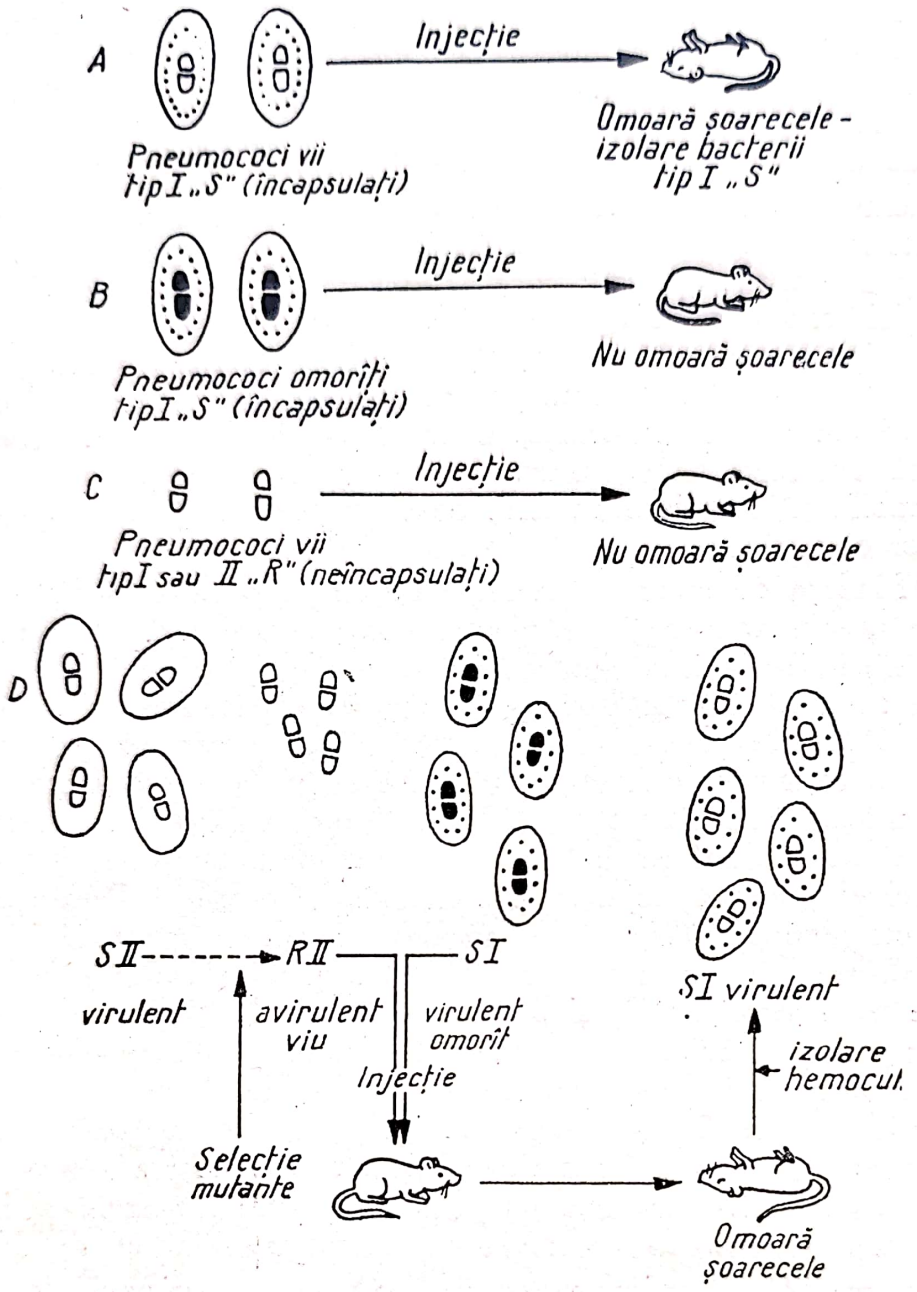


Fig. 325. Experiența de transformare a pneumococilor efectuată de Griffith:

A, *B* și *C* — teste de control al virulenței pentru șoarece a tulpinilor de pneumococ utilizate; *D* — inoculate împreună cu celule „S" virulente de tip I omorîte prin căldură, celulele mutante „R" avirulente vii de tip II se transformă în celule „S" virulente de tip serologic I, sub acțiunea ADN liberat din celulele tulpinii omorîte.

narea, adică integrarea lui în regiunea omologă a genomului gazdei, nu ajunge să se facă decît cu o frecvență destul de redusă.

Reevaluată în lumina cunoștințelor ulterioare relative la capacitatea transformată a ADN, transformarea pneumococului observată de Griffith se explică prin aceea că aportul de material genetic aparținînd pneumococilor

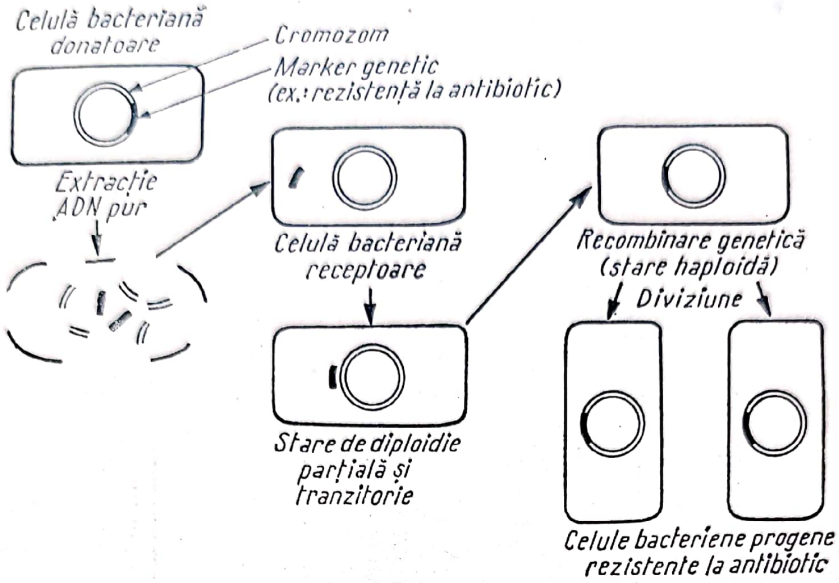


Fig. 326. Reprezentare schematică a procesului de transformare genetică la bacterii.

capsulați de tip III înzestrează celulele necapsulate de tip II cu determinanții genetici ai căilor metabolice de sinteză a polizaharizilor capsulari de tip III. În mod similar pot fi transmiși, de altfel, și alți determinanți genetici, cum ar fi aceia care conferă unor celule bacteriene rezistența la un antibiotic sau capacitatea de sinteză a unei enzime implicate în anabolismul sau catabolismul celular. Fiecare dintre noile caractere dobîndite de celulele competente reprezintă un „marker", adică o însușire specifică în funcție de care pot fi izolate pe medii selective numai acele celule care au suferit transformarea în sensul respectiv.

Procesul de transformare evoluează în cîteva etape succesive, care sînt: *a*) *fixarea* fragmentului de ADN exogen pe celula receptoare; *b*) *pătrunderea* și încorporarea acestui fragment în celulă; *c*) *asocierea* exogenotului cu segmentul omolog al endogenotului; *d*) *integrarea* prin recombinare a unei secvențe de ADN transformant în molecula de ADN endogen, pe calea substituirii unei regiuni a acestei molecule corespunzînd la una sau mai multe gene, și degradarea prin acțiunea dezoxiribonucleazei a restului de ADN rămas neintegrat în cromozom; *d*) *replicarea* secvenței integrate, purtătoare de informație genetică exogenă, o dată cu replicarea întregii molecule de ADN endogen a cărei parte constitutivă a devenit, ceea ce determină apariția la celulele-fiice a unor modificări fenotipice, reflex al modificărilor genotipice derivînd din recombinare.

În ceea ce privește semnificația biologică a transformării genetice, proces descoperit în laborator, este posibil ca și în anumite condiții naturale, unde în mod obișnuit populațiile bacteriene sînt eterogene, ADN eliberat prin liză celulară să pătrundă în celulele competente, transmițîndu-le după recombinare caractere genetice noi supuse selecției naturale. Acționînd ca un mecanism

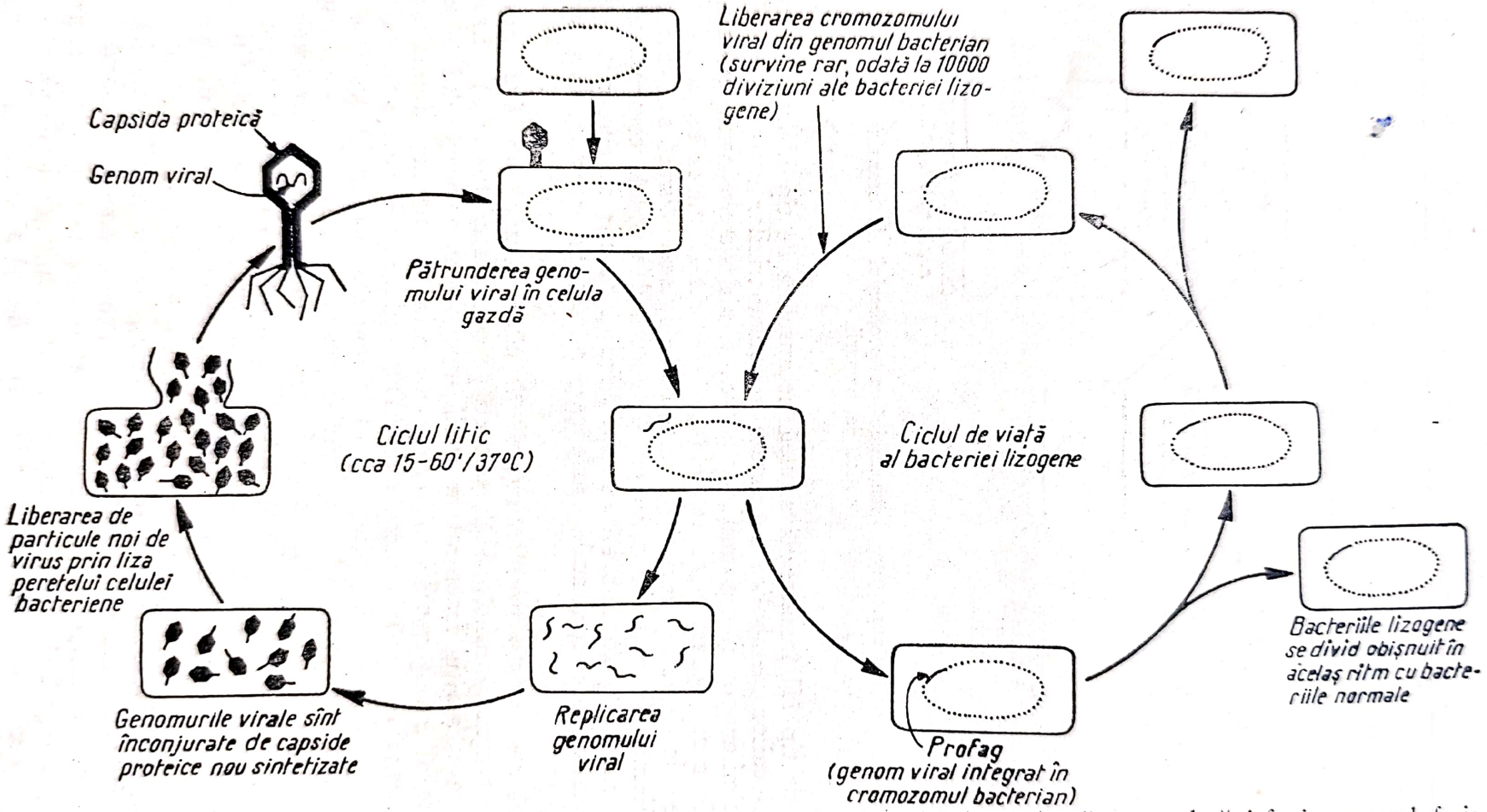


Fig. 327. Raporturile dintre genomul fagilor temperați și cromozomul bacterian în cazul bacteriilor lizogene: după infecție, genomul fagic poate rămîne autonom în citoplasmă, unde se replică și inițiază o infecție litică, sau este integrat ca profag în cromozonul bacteriei, care astfel devine lizogenă (după Watson).

Scanned with OKEN Scanner

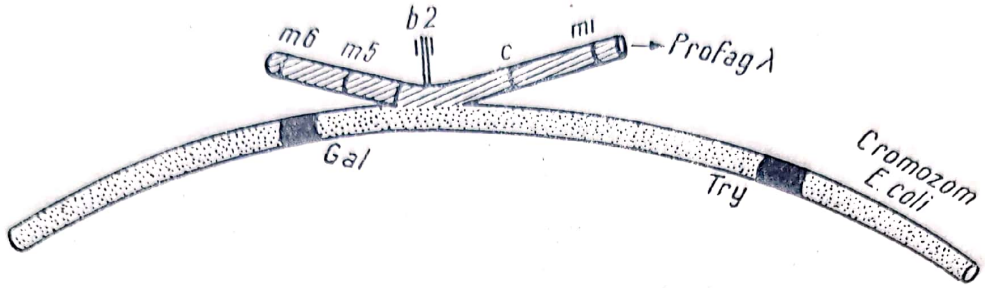


Fig. 328. Modelul lui Jacob și Wollman de integrare a genomului fagic în cromozomul bacterian. Profagul λ apare „agățat" de cromozom într-o zonă de omologie a celor două genomuri.

sexual primitiv, acest proces ar putea contribui la apariția unor genotipuri modificate, deci la geneza unor clone noi, mai bine adaptate condițiilor de mediu.

Transducția

Transducția este transferul unui fragment de material genetic de la o bacterie la alta, prin intermediul unui fag temperat.

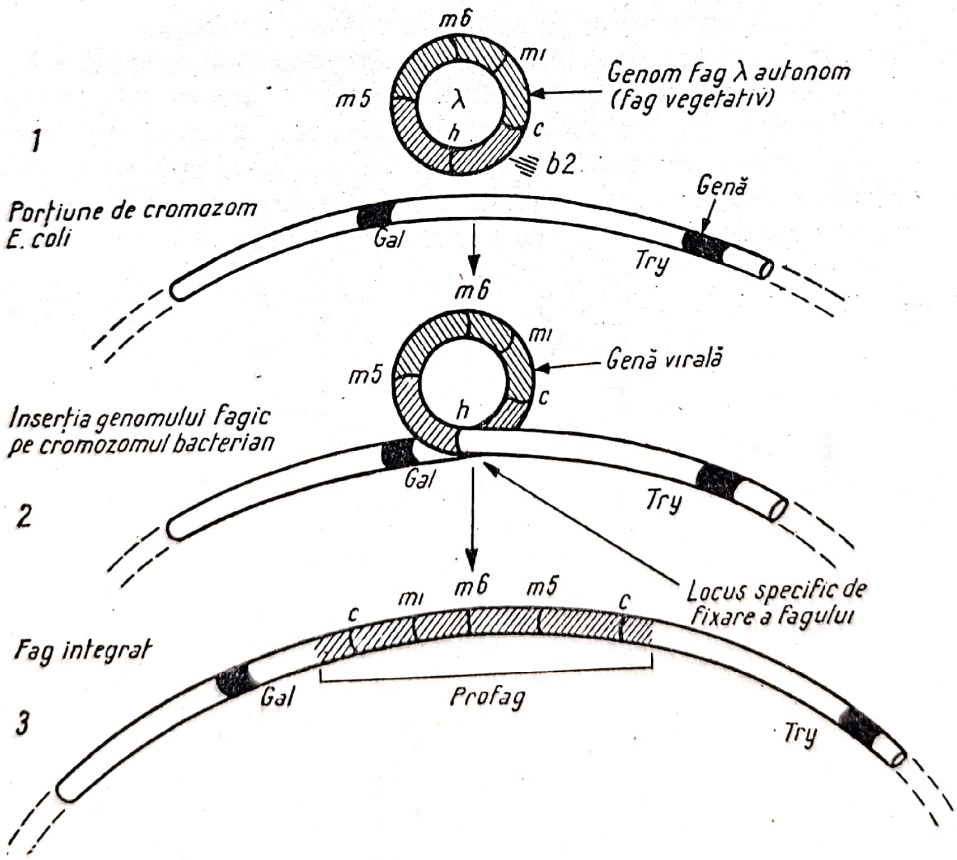


Fig. 329. Modelul lui Campbell de integrare a genomului fagic în cromozomul bacterian (*1*, *2*). Profagul apare ca o structură inclusă în continuitatea cromozomului bacterian (*3*).

Fagul temperat purtat de bacteriile lizogene constă exclusiv dintr-un *genom fagic* sau *profag*, care se prezintă ca un segment de material genetic substituit unui fragment din cromozomul bacterian, aflîndu-se, prin urmare, în stare de episom integrat. Mecanismul acestei integrări este încă discutat. În timp ce Jacob şi Wollman admit că profagul ar fi „agăţat" de cromozomul bacteriei-gazdă, Campbell şi col. pledează pentru un alt mod de integrare, mai uşor de explicat la nivel molecular. Astfel, înainte de integrarea sa, genomul fagic — un cromozom de formă circulară — se fixează de o regiune specifică a genomului celulei-gazdă. În momentul lizogenizării celulei bacteriene, cei doi cromozomi, bacterian şi fagic, ambii de formă circulară, se rup şi apoi se unesc între ei, astfel încît cromozomul viral se leagă prin extremităţile sale de capetele rupte ale celui bacterian. Profagul ar fi deci integrat prin *crossing-over*, astfel încît el se prezintă ca o structură liniară înglobată în inelul cromozomic bacterian.

Studiind relaţia dintre fagul temperat şi bacteria-gazdă, Zinder şi Lederberg (1952) au observat că profagul care evoluează spre stadiul de fag virulent, litic, poate uneori — în momentul cînd se desprinde din genomul bacterian — să rupă şi să antreneze cu sine şi un fragment adiacent din cromozomul celulei-gazdă, care este apoi dezagregată prin liză fagică. Într-o asemenea situaţie, în care de genomul fagic sînt ataşate gene bacteriene, la un nou ciclu de infecţie bacteriofagul poate introduce aceste gene într-o celulă bacteriană înrudită cu aceea de la care provine fragmentul de genom bacterian. Transducţia este efectivă dacă genele străine se pot integra prin recombinare în genomul noii gazde lizogenizate. În cazul în care exogenotul transdus de fag poartă o informaţie genetică diferită de aceea a fragmentului omolog de endogenot căruia i s-a substituit, fenomenul de transducţie determină modificări corespunzătoare ale fenotipului bacteriei receptoare.

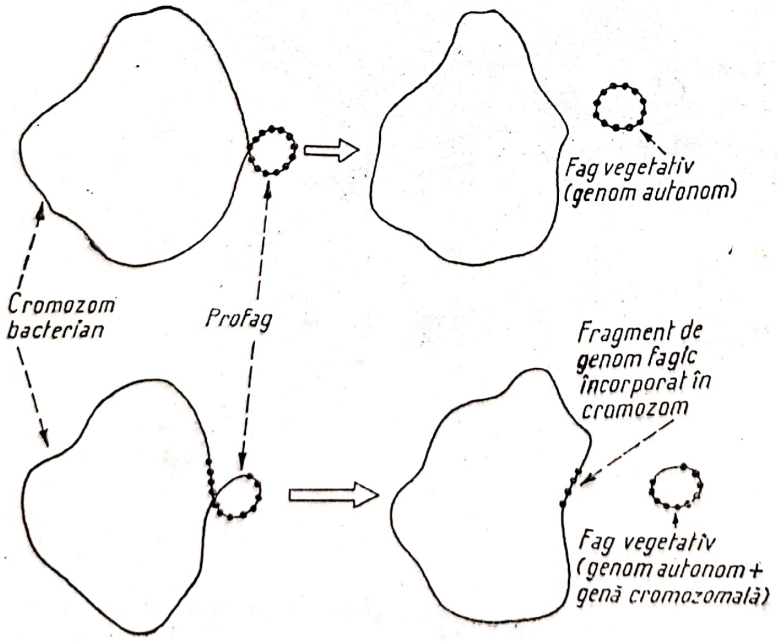


Fig. 330. Trecerea genomului fagic de la starea integrată în cromozomul bacterian la starea autonomă: *sus* — separarea normală a genomului fagic; *jos* — separarea aberantă, cu încorporarea unui fragment cromozomal (după Braun).

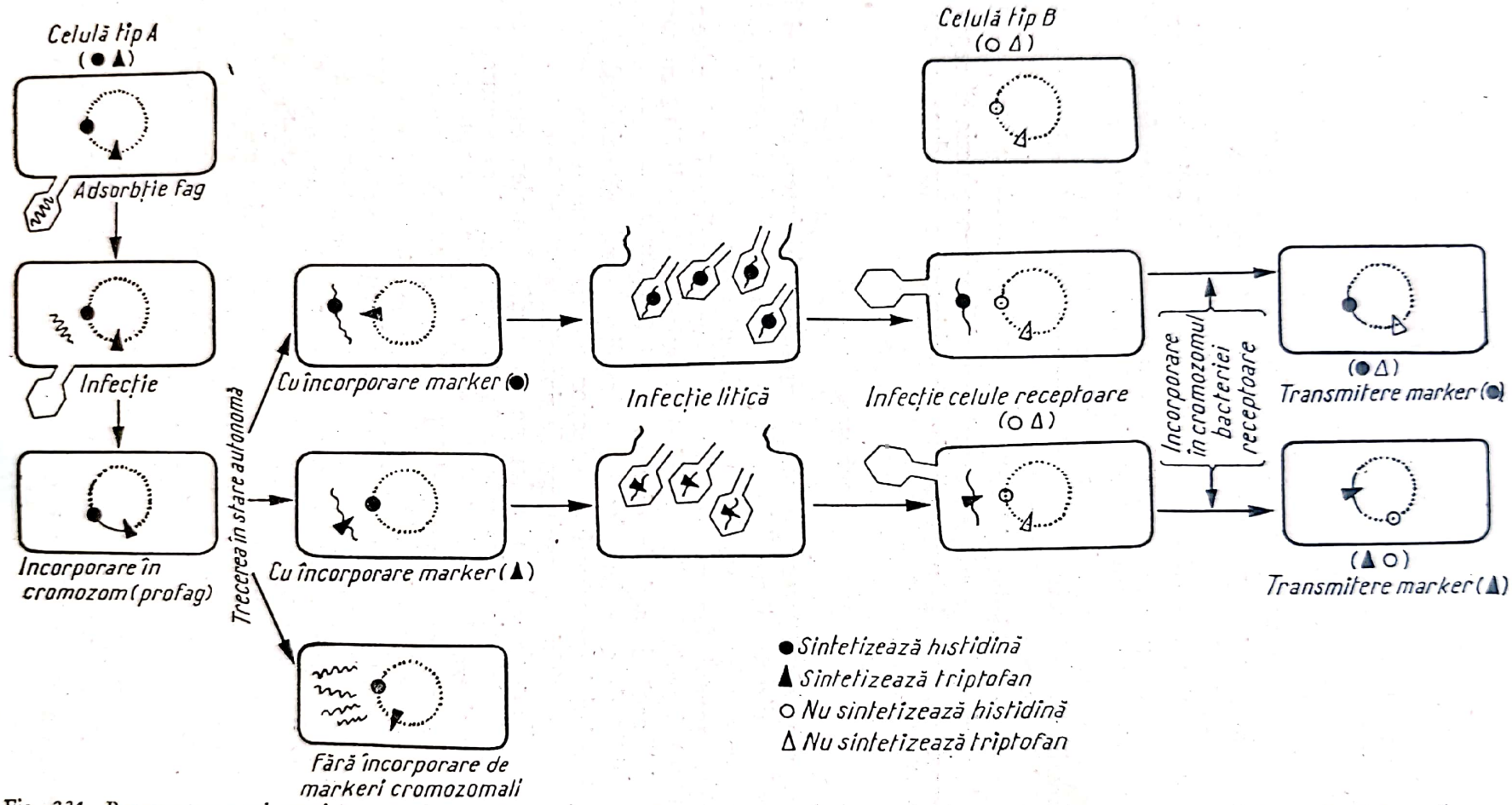


Fig. 331. Reprezentare schematică a unei experiențe de transducție demonstrînd transferul unor markeri cromozomali între două bacterii aparținînd aceleași specii și sensibile la același fag, dar avînd anumite diferențe genetice (capacitatea de a face sau nu sinteză de triptofan și histidină).

Scanned with OKEN Scanner

În figura 331 este prezentată schematic desfăşurarea procesului de transducţie de la celula donatoare *A* la celula receptoare *B*, care aparţine aceleiaşi specii, este sensibilă la acelaşi fag, dar prezintă unele diferenţe genetice faţă de donatorul *A*, de unde posibilitatea folosirii unor „markeri" pentru identificarea recombinanţilor.

Fenomenul de transducţie a fost pus în evidenţă la bacterii din genurile *Staphylococcus, Escherichia, Pseudomonas, Vibrio* şi *Proteus*, la care, în condiţii naturale, transducţia se produce cu o frecvenţă joasă: numai una din 10^5—10^8 particule fagice se comportă ca fag transductor, adică transportă în genomul său o genă bacteriană. În cursul transducţiei se transferă de altfel numai un mic fragment de genom bacterian. Pe de altă parte, prezenţa caracterului marcant este rareori evidenţiată, deoarece numai una din 10^5 bacterii receptoare prezintă acest caracter nou ca urmare a integrării prin recombinare a exogenotului.

Ţinînd seama de incidenţa ridicată a fagului temperat şi de abundenţa populaţiilor bacteriene în natură este totuşi probabil ca transducţia să reprezinte modul de transfer genetic în urma căruia recombinarea se produce cu cea mai mare frecvenţă.

Conjugarea

Conjugarea reprezintă *transferul genetic* realizat prin intermediul unei legături intercelulare directe şi condiţionat de prezenţa în celula bacteriană donatoare a unui element genetic specializat numit *conjugon*.

Descoperirea acestui fenomen se datoreşte cercetătorilor Lederberg şi Tatum (1946). Pornind de la o tulpină sălbatică de *E. coli K*12 cu caracter prototrof, adică aptă de a-şi sintetiza ea însăşi factorii de creştere necesari şi, ca atare, capabilă de a se dezvolta pe un mediu de cultură minimal lipsit de aceşti factori, cei doi cercetători au selecţionat două mutante auxotrofe avînd drept „markeri" genetici incapacitatea de sinteză a cîte doi factori de creştere, ceea ce face obligatorie cultivarea lor pe un mediu complet, care să conţină factorii respectivi. Selecţia a fost făcută în aşa fel încît fiecare mutantă incapabilă să-şi sintetizeze doi factori de creştere, putea în schimb să elaboreze cei doi factori de creştere pe care cealaltă nu-i putea sintetiza. După cultivarea separată a celor două tulpini auxotrofe pe un mediu complet conţinînd cei patru factori de creştere — deci satisfăcînd exigenţele ambelor tulpini — pe un mediu minimal solid lipsit de factori de creştere s-au însămînţat, în cantităţi egale de celule, atît fiecare tulpină separat, cît şi un amestec din ele. La examinarea plăcilor după incubare s-a observat că, dacă pe plăcile unde tulpinile auxotrofe fuseseră însămînţate separat nu crescuse nici o cultură, pe plăcile însămînţate cu amestecul celor două tulpini apăruseră după două zile circa 20 de colonii, care erau desigur prototrofe, deci capabile să sintetizeze toţi cei patru factori de creştere, deoarece altfel nu s-ar fi putut dezvolta pe mediul minimal.

Căutîndu-se explicaţia acestui fenomen, s-a avut mai întîi în vedere faptul că utilizarea unor tulpini auxotrofe dublu mutante, adică deficiente în ceea ce priveşte sinteza a cîte doi factori de creţere (++—— şi ——++), exclude

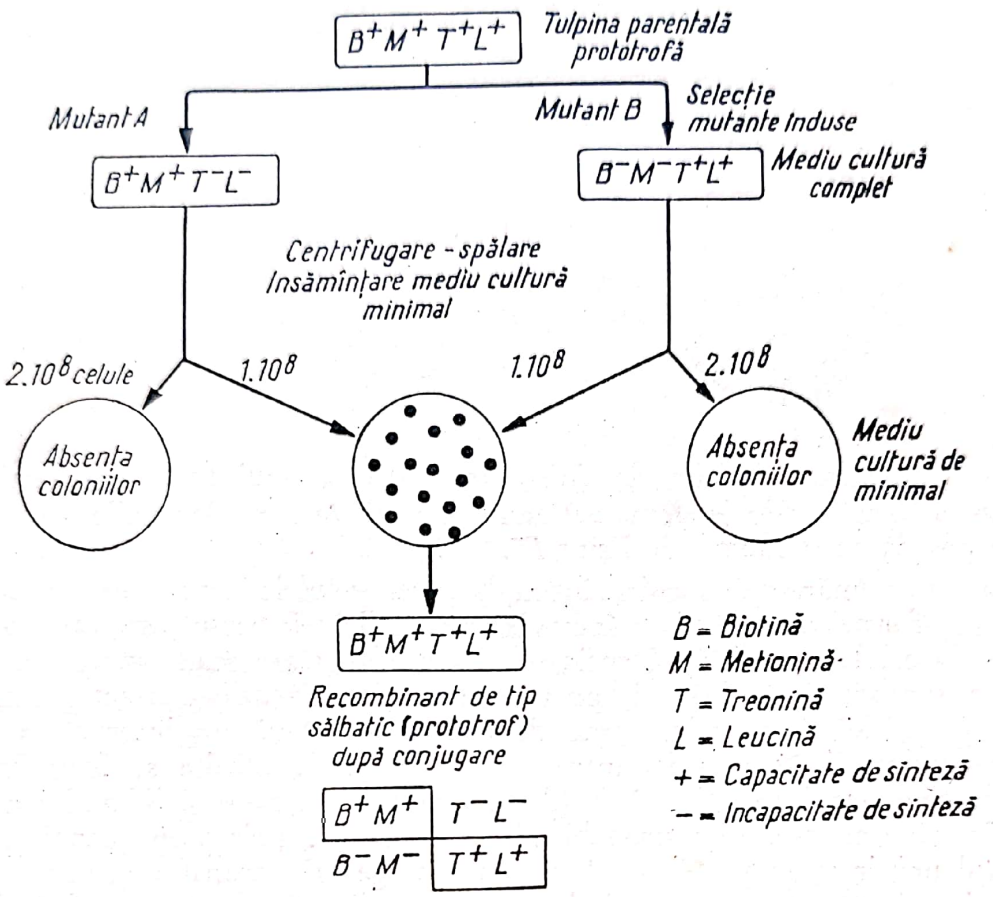


Fig. 332. Schema experienţei lui Lederberg şi Tatum demonstrînd transferul de material genetic prin conjugare la *E. coli K 12*.

de la început posibilitatea unei reversii spontane la condiţia prototrofă (++ ++), deoarece probabilitatea reversei este extrem de mică (10^{-14}—10^{-16} pe generaţie de celule). Rămînea ca plauzibilă ipoteza unui transfer genetic între bacteriile diferite genotipic, însămînţate împreună pe mediul minimal. Cultivarea lor în mediu lichid în cîte una din ramurile unui tub în formă de „*U*", separate printr-un filtru poros, nu a mai avut ca efect apariţia de tulpini prototrofe, ceea ce a confirmat presupunerea că dezvoltarea de colonii prototrofe pe mediul solid era rezultatul unui transfer genetic realizabil numai în condiţiile unui contact „direct" între celulele celor două tulpini. Faptul că deplasarea repetată, sub presiune, a lichidului de cultură dintr-o parte în alta a filtrului poros separator era ineficientă pentru reconstituirea prototrofiei, excludea intervenţia ca agent transformant a ADN eliberat din celule lizate şi sugera necesitatea unui contact obligatoriu între celule intacte, vii. Ulterior, studii de microscopie electronică şi analiza genetică au confirmat această ipoteză, dovedind realitatea transferului de material genetic printr-un proces de conjugare între celulele bacteriene.

Fazele procesului de conjugare. Transferul genetic prin conjugare este con-

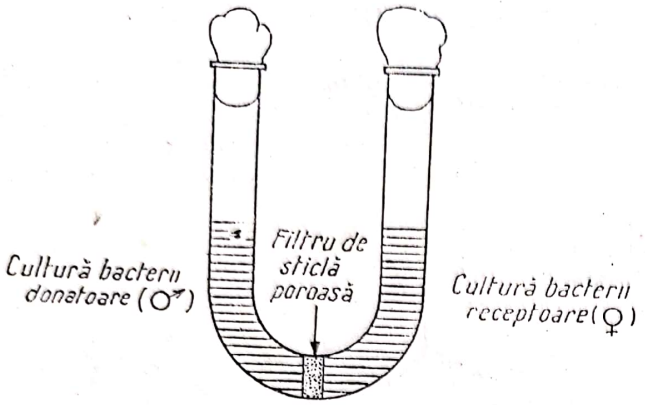


Fig. 333. Tub în formă de „U" utilizat pentru demonstrarea transmiterii materialului genetic prin conjugare.

diţionat de prezenţa, la celulele donatoare (♂), a unui factor de fertilitate denumit factorul *F* (de la *fertility*) sau *factorul de sex*. Bacteriile receptoare (♀) nu posedă acest factor, deci sînt F^-.

După un număr de ciocniri întîmplătoare, celulele opuse ca sexualitate (♂ şi ♀) formează perechi de încrucişare specifică. Procesul este favorizat de apariţia, la celulele ♂, a unui antigen de suprafaţă care scade încărcătura negativă a suprafeţei celulare şi, prin aceasta, favorizează contactul intim şi aderarea specifică între celule apte de conjugare. După un interval de timp necesar producerii de energie, între cele două celule alipite se formează un canal de conjugare, gros de 50 Å (Anderson, Jacob şi Wollman), a cărui sinteză este asigurată probabil de bacteria ♂. Prin acest canal se face transferul unidirecţional (♂ → ♀) de material genetic, transfer întrerupt apoi, de obicei, prin ruperea canalului de conjugare. După ce a fost astfel „fecundată", bacteria receptoare devine pentru scurt timp un merozigot, adică un zigot parţial, deoarece pe lîngă propriul său genom intact conţine şi exogenotul provenit de la celula donatoare. Fragmentul de material genetic exogen este apoi parţial sau total integrat în endogenot prin recombinare, după care urmează replicarea cromosomului recombinant şi segregarea cromosomilor-fii

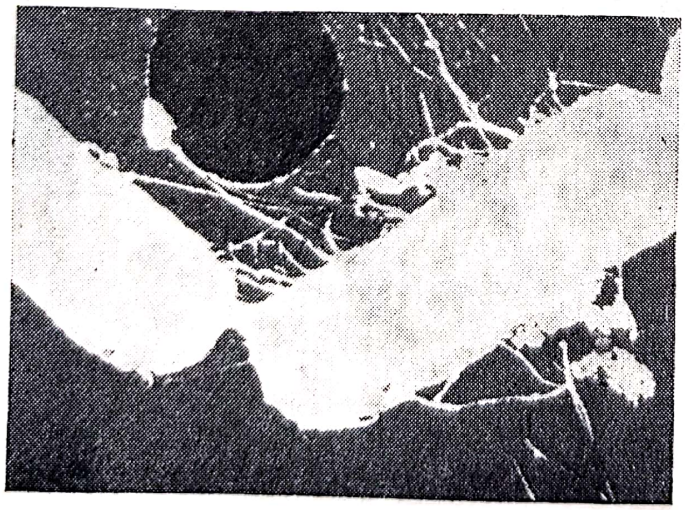


Fig. 334. Celule de *E. coli K 12* legate printr-o punte citoplasmatică sau canal de conjugare (după Anderson).

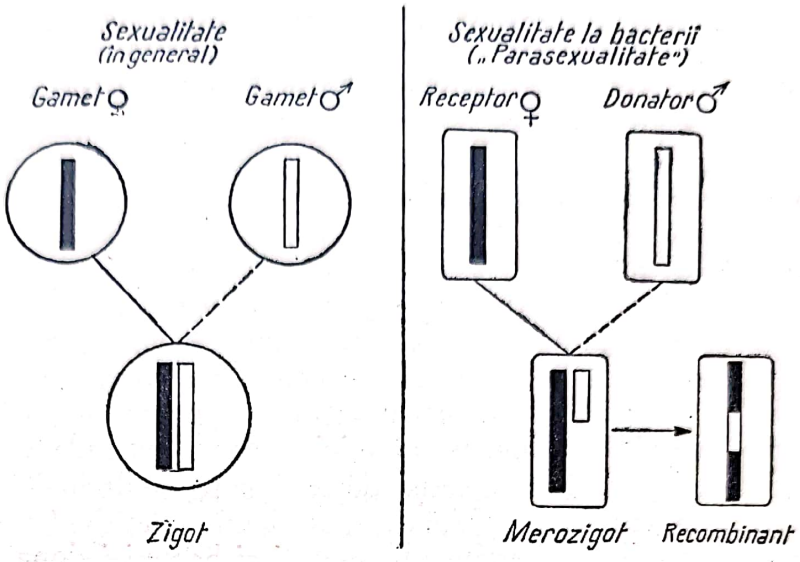


Fig. 335. Reprezentare schematică a fenomenului de sexualitate în general şi a celui specific bacteriilor („parasexualitate").

rezultaţi. Determinanţii unor caractere noi aduşi de exogenot şi incluşi acum în endogenot se exprimă fenotipic prin apariţia unor proprietăţi noi la celulele-fiice rezultate prin diviziunea celulei parentale „fecundate", dar genotipul acestor celule rămîne cu predominenţă similar aceluia al celulei receptoare-mamă. Pentru a-l deosebi de fenomenele de sexualitate, caracteristice organismelor superioare, acest proces caracterizat în esenţă prin aportul genetic inegal al celor două celule parentale (gameţi) a fost numit proces de *parasexualitate*. Realitatea canalului de conjugare ca organit specific acestui proces de transfer genetic a fost contestată de Brinton, care socoteşte că imaginea electronooptică invocată ca dovadă de alţi autori, reprezintă un artefact observat şi pe microelectronografiile unor populaţii formate exclusiv din celule femele de tip F^-. După acest cercetător, organitele special adaptate pentru transportul cromozomului în cursul conjugării sînt apendicele celulare performate denumite *pili de tip F*, cărora li se poate atribui rolul de „conductori" în procesul de transfer genetic pe baza următoarelor argumente: *1*) structura lor de tubi proteici, cu diametrul de 25 Å, perfect adecvată acestei funcţii; *2*) capacitatea lor de a media fixarea fagilor cu ARN (fagi de tip *R*17, *M*12) şi infectarea celulei-gazdă cu acidul nucleic al acestor fagi lipsiţi de „coadă", injectarea ARN fagic realizîndu-se prin intermediul pili-

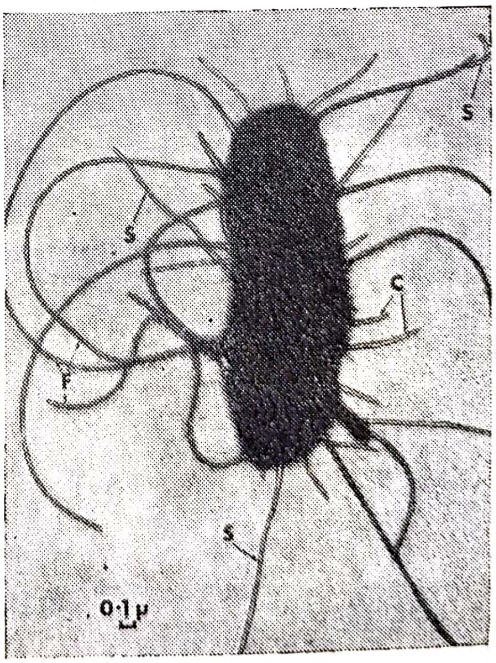


Fig. 336. Celulă de *E. coli* cu pili de tip F (*S*), pili obişnuiţi (*C*) şi flageli (*F*) (după Meynell).

lor *F*, care în această împrejurare funcţionează drept „seringă", aidoma „cozii" fagilor cu ADN; *3*) exclusivitatea prezenţei pililor *F* la bacteriile mascule; *4*) pierderea capacităţii de donator de material genetic şi a sensibilităţii faţă de fagii cu ARN la bacteriile la care pilii *F* au fost suprimaţi şi restabilirea acestor însuşiri o dată cu reconstituirea pililor *F*; *5*) imaginea electronomicroscopică a legării celulelor mascule şi femele prin intermediul pililor; *6*) aspectul secţiunilor ultrafine prin bacterii în curs de conjugare, la care nu se observă dispariţia peretelui celular şi a membranei citoplasmatice la nivelul presupusului canal de conjugare; *7*) menţinerea viabilităţii celulelor şi a integrităţii ansamblului constituenţilor lor celulari esenţiali în urma ruperii oricît de brutale a organitului care asigură conexiunea celulelor în curs de conjugare; *8*) trecerea de la o celulă la alta numai a ADN şi, probabil a cîtorva alte molecule de dimensiuni mici, ceea ce exclude ca improbabilă conexiunea intercelulară printr-un canal de conjugare, mult mai larg decît lumenul pililor, care ar permite ca, o dată cu materialul genetic, să se scurgă prin el şi o bună parte din ceilalţi constituenţi celulari ai bacteriei donatoare.

Natura factorului F şi rolul lui în conjugare. Factorul de sex *F* este un *episom* care are structura unei molecule circulare de ADN dublu helical, cu o lungime totală de 20—40 mμ corespunzînd la aproximativ 100 de gene, adică la 10^5 perechi de nucleotide, ceea ce reprezintă aproximativ 2% din cromozomul bacterian (Adelberg). El este dotat cu capacitatea de replicare independentă atunci cînd se găseşte în stare autonomă în citoplasmă, poate suferi mutaţii şi se deosebeşte de cromozomul bacterian numai prin mărime şi prin rata sa de replicare. Prezenţa lui conferă celulei bacteriene mascule anumite proprietăţi particulare ca *a*) aptitudinea de sinteză locală, la locul inserţiei lui pe membrana citoplasmatică, a unui antigen de suprafaţă care face posibil contactul cu celula femelă şi favorizează conjugarea între cele două celule alipite; *b*) capacitatea de formare a canalului de conjugare; *c*) prezenţa pililor de tip *F*.

În stare autonomă, acest episom se replică în citoplasmă şi poate fi transferat el însuşi la o celulă femelă, iar în stare integrată, incorporat în cromo-

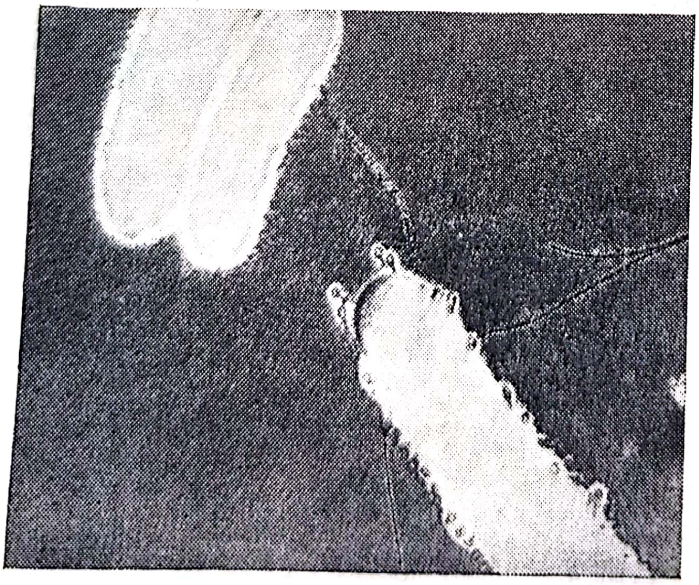
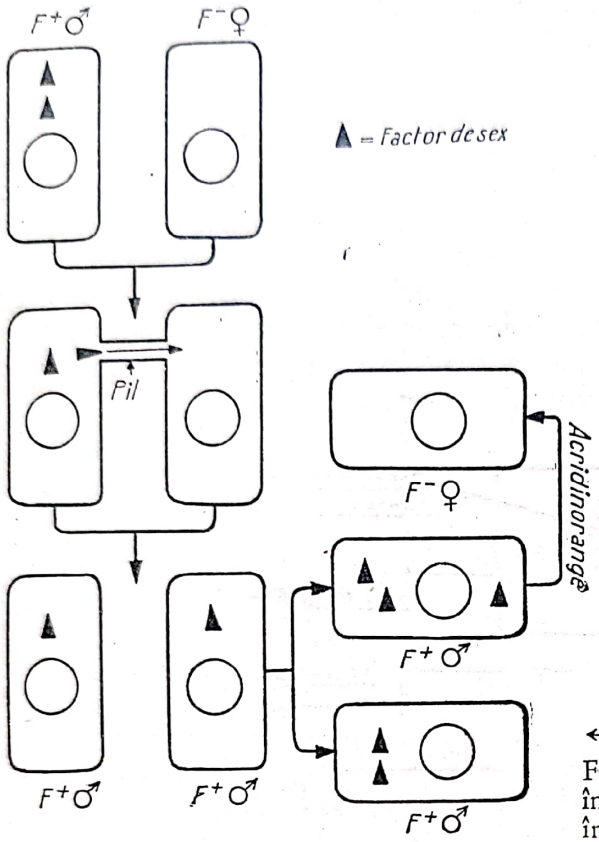


Fig. 337. Bacterii legate printr-un pil F. Celula ♂ este marcată prin adsorbţia fagilor ARN ♂ *M 12* pe suprafaţa pilului F, iar celula ♀ prin adsorbţia unor fagi de tip T_6 (după Brinton).



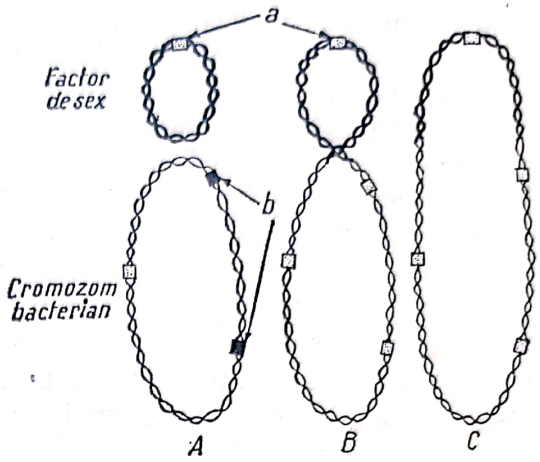


Fig. 339. Integrarea factorului de sex în structura cromozomului bacterian. Pătratele marchează poziţia ipotetică a replicatorilor factorului de sex şi ai cromozomului (după Adelberg).

Fig. 338. Conjugarea între bacteriile F+ şi F−: în cursul conjugării un episom de sex trece în celula receptoare conferindu-i caracter de ♂.

zomul celulei mascule, el se replică o dată cu acesta şi îi determină „mobilizarea" şi transferul parţial în celula receptoare femelă.

În funcţie de prezenţa şi starea — autonomă sau integrată — a factorului episomatic de fertilitate *F*, se deosebesc mai multe tipuri de bacterii *E. coli* K12, care au moduri diferite de comportare sexuală: tipul *F*, lipsit de factorul de fertilitate şi tipurile mascule, care îl posedă, F^+, *Hfr* şi *F'*,

Conjugarea între bacterii F^- şi F^+. Celulele F^+, cu caracter de donator, au proprietatea de a transfera factorul de sex *F*, de obicei multiplu în citoplasma lor, unor bacterii F^- cu caracter de receptor. Transferul se face cu o eficienţă foarte mare (pînă la 100%), astfel încît caracterul F^+ se răspîndeşte în mod „epidemic" în populaţia bacteriană, ceea ce determină scăderea proporţiei de celule F^-.

În acest sistem de conjugare nu se transferă de obicei gene cromozomice, cromozomul bacterian în formă de cerc închis nefiind transferabil ca atare. Starea de mascul F^+ poate fi abolită prin acţiunea unor substanţe chimice, ca acridin-oranj, care inhibă selectiv replicarea în citoplasmă a factorului de sex, transformînd astfel celulele F^+ în celule F^-.

Conjugarea între bacterii F^- *şi bacterii Hfr*. Unele bacterii F^+ pot suferi mutaţii — survenite cu o frecvenţă mică, de 10^{-4}—10^{-5} pe generaţia de celule — care dau naştere unei stări de *supermascul* denumită prescurtat *Hfr* (*High frequency of recombination*). Această stare implică aptitudinea de recombinare cu frecvenţă mare, datorită inserării şi integrării episomului *F* în continuitatea

cromozomului bacterian al celulei masculе, şi anume într-o regiune a acestuia pentru care episomul are o afinitate particulară.

Trecerea de la stare F^+ la starea *Hfr* conferă celulei proprietăţi noi în ceea ce priveşte replicarea materialului genetic şi comportarea în procesul de conjugare: *a*) o dată integrat în cromozom, factorul *F* încetează să se mai replice autonom şi nu mai este transmisibil decît excepţional de rar, întrucît el constituie totdeauna porţiunea terminală a cromozomului angajat în transferare în cursul conjugării; *b*) replicarea factorului *F* integrat, sincronă cu aceea a cromozomului, nu mai poate fi inhibată prin acridin-orange, substanţă activă numai asupra episomului citoplasmatic; *c*) în timpul conjugării se produce ruperea cromozomului circular, urmată de transferul lui cu randament mare (pînă la 100%), sub forma unei structuri liniare polarizate.

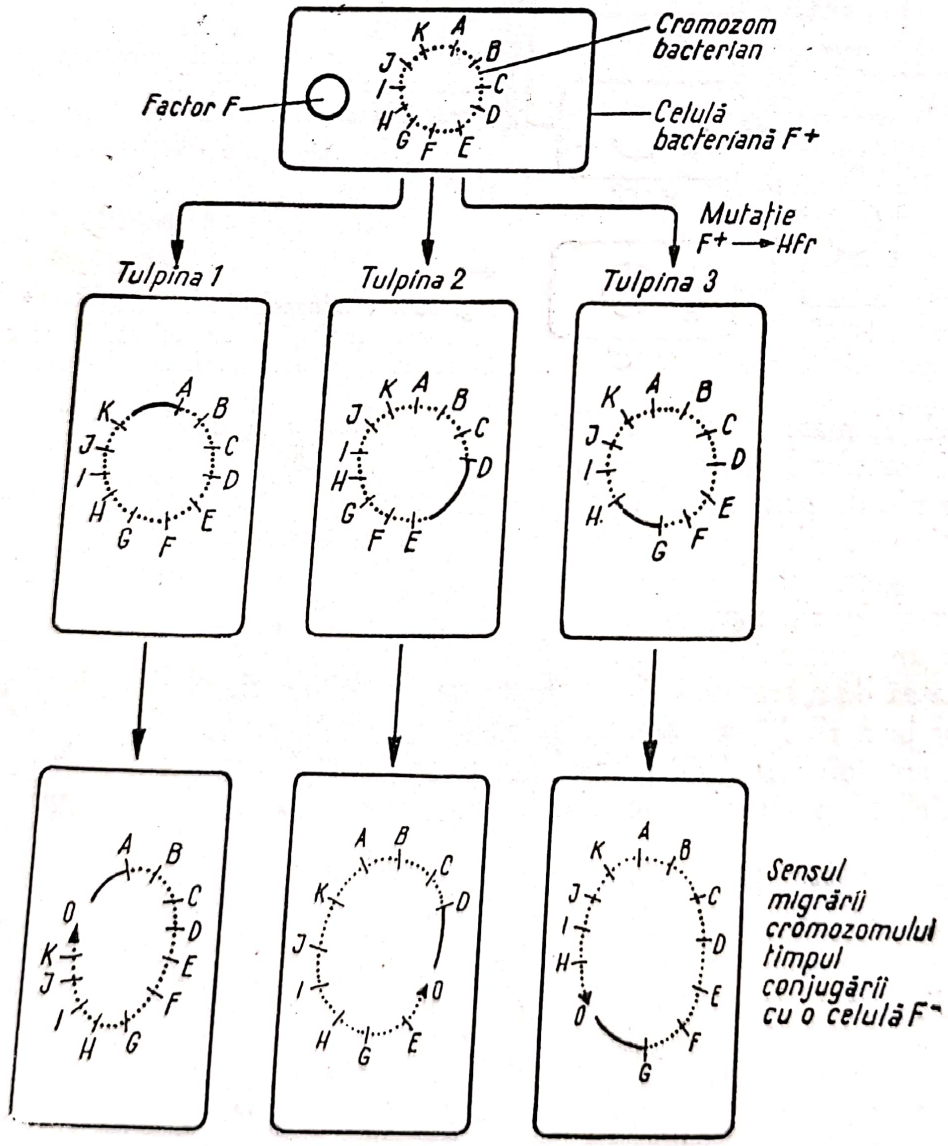


Fig. 340. Reprezentare schematică a apariţiei tulpinilor *Hfr* din tulpini F^+ la care prin mutaţie factorul de sex este integrat în cromozom în diferiţi loci ai acestuia (mutantele 1, 2 şi 3).

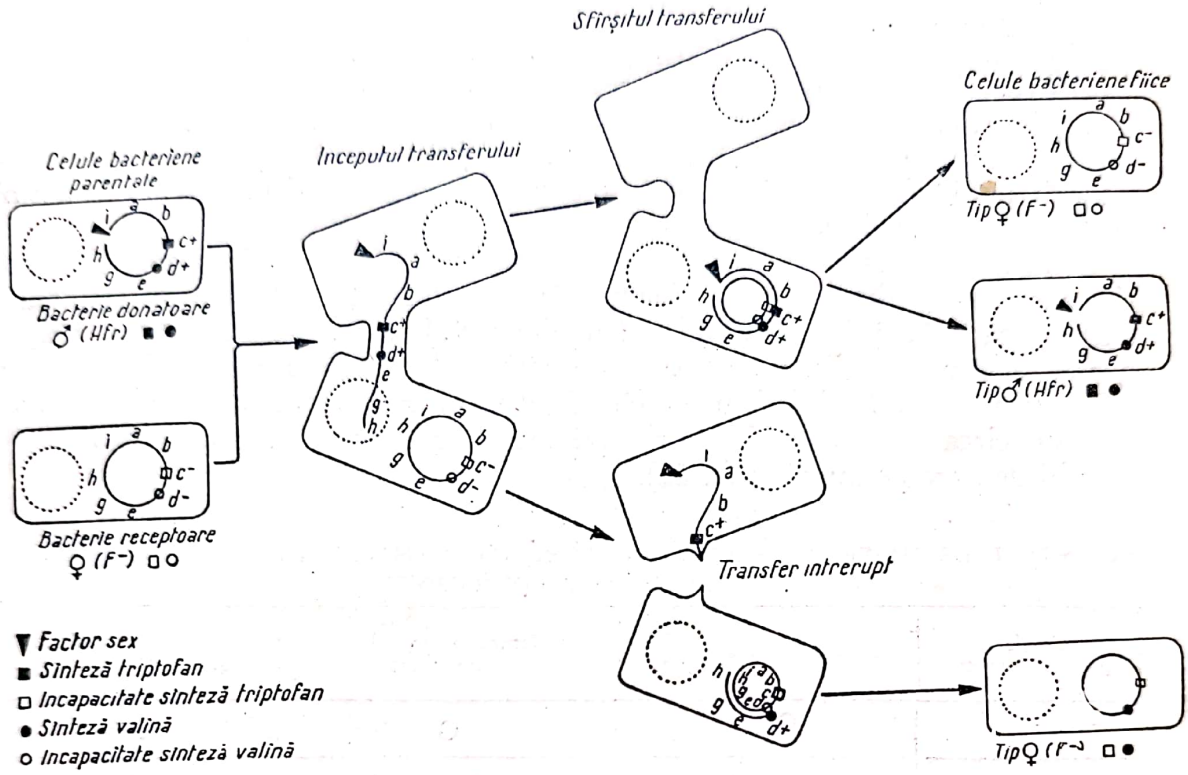


Fig. 341. Reprezentare schematică a procesului de conjugare la *E. coli* între o celulă *Hfr* şi una F^-; *sus* — transferul integral al cromozomului inclusiv factorul *F*; *jos* — transferul parţial (un singur marker genetic) datorită întreruperii procesului.

După cum s-a demonstrat experimental, pe cromozomul bacterian există aproximativ 10—12 sedii sau poziţii la nivelul cărora poate avea loc integrarea episomului *F*. Aceste sedii reprezintă regiuni ale cromozomului care sînt omologe, din punctul de vedere al secvenţei bazelor, cu una sau mai multe regiuni ale factorului *F*. Punctul specific de deschidere a inelului cromozomic poate fi situat în oricare dintre aceste regiuni, în funcţie de locul de inserţie — caracteristic pentru o tulpină dată — al factorului *F* pe cromozom, iar transferul genelor, deci al „markerilor" cromozomici, se face într-o ordine determinată de locul unde s-a produs această rupere a cromozomului. Se dovedeşte astfel încă o dată că, de fapt, cromozomul bacterian nu are un „început" şi un „sfîrşit" definite, ci că are pur şi simplu forma unui cerc închis. Astfel, dacă un cromozom este alcătuit din gene care se succed în ordinea *A*, *B*, *C*, *D*, . . . , *Z*, prima genă angajată în transfer poate fi oricare dintre ele, cu condiţia proximităţii ei de locul de inserţie al factorului *L*, care ca urmare, după ruperea cromozomului la acest nivel, ajunge să fie situat la extremitatea opusă a structurii devenite liniare. Pătrunderea în celula receptoare începe deci întotdeauna cu capătul liber al cromozomului sau *originea* lui (notată „O"), după care se succed, în ordine, genele următoare, episomul integrat *F* ajungînd să fie transferat ultimul.

În mod obişnuit, datorită unor condiţii de mediu (în special agitarea mecanică) procesul de conjugare are tendinţa să se întrerupă la întîmplare, înainte

ca să fi ajuns să se producă şi transferul ultimelor gene cromozomice urmate de factorul *F* situat în porţiunea terminală a cromozomului. De aceea „markerii" genetici se transmit cu o frecvenţă proporţională cu apropierea genelor corespunzătoare de „originea" („O") cromozomului. Astfel, în sistemul de conjugare F^-Hfr bacteriile din descendenţa celulei fecundate sînt în marea lor majoritate de fenotip F^-, întrucît factorul de sex nu ajunge să fie transmis decît excepţional de rar.

Contrariu a ceea ce ar fi de aşteptat, transferul întregului cromozom bacterian necesită o durată de conjugare de circa 90—120 de minute. Pentru o bacterie care, la 37°C, se divide în mod normal la fiecare 20—30 de minute, durata actului sexual la aceeaşi temperatură depăşeşte aproximativ de patru ori durata normală a vieţii unei celule. În cazul cromozomului de *E. coli*, alcătuit din circa 10^7 nucleotide, prin puntea de conjugare trec aproximativ 10^5 perechi de baze pe minut (tab. 22).

TABELUL 22

TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC ŞI RECOMBINAREA ÎN FUNCŢIE DE TIPUL SEXUAL AL BACTERIILOR CONJUGANTE

Celule puse în contact	Frecvenţa recombinării	Natura materialului transferat	Tipul sexual al celulelor progene
F^- F^-	O	O	F^-
$F+$ $F+$	Extrem de mică	Factorul de sex	$F+$
$F+$ F^-	Mică (1 la 10^5)	Factorul de sex	$F+$
Hfr F^-	Mare (1 la 10^2)	Fragment cromozom	F^-
		Întregul cromozom + factorul de sex (excepţional)	$F+$ (excepţional)

Tipul $F+$ (♂) este considerat ca tip normal (sălbatic).
F^- = celule ♀.
$F+$ = celule ♂.
Hfr = celule ♂ cu mare frecvenţă de recombinare.

Mecanismul transferării cromozomului în cursul conjugării. Nu se ştie dacă materialul cromozomic transferat este o copie a cromozomului preexistentă conjugării sau dacă el rezultă dintr-o replicare a ADN iniţiată abia în momentul formării legăturii dintre celule. Este însă dovedit că transferul cromozomului nu sărăceşte în informaţie genetică celula donatoare, astfel încît este de presupus că materialul transferat constă dintr-o copie rezultată din replicarea ADN depozitar al acestei informaţii.

Conform modelului lui Jacob şi Brenner, conjugarea declanşează replicarea ADN, astfel încît un exemplar rămîne în celula masculă donatoare, iar celălalt trece în celula femelă receptoare. Un anumit metabolit elaborat în cursul formării tubului de conjugare ar declanşa replicarea, care începe la nivelul replicatorului *F*. Ca urmare, originea sau punctul conducător

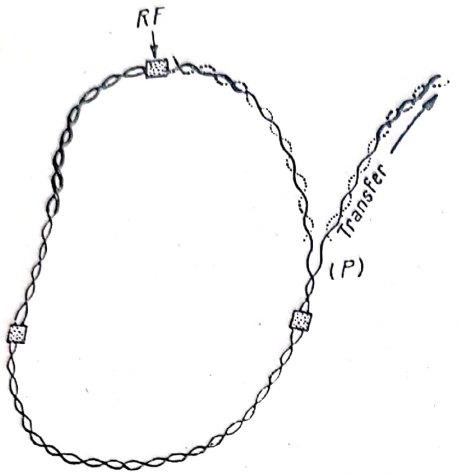


Fig. 342. Modelul Jacob-Brenner de transfer a cromozomului în timpul conjugării (după Adelberg):
RF — replicator factor sex; *P* — locul de fixare al ADN-polimerazei.

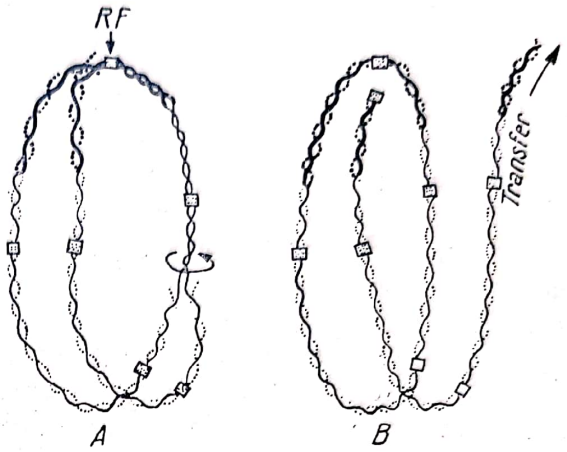


Fig. 343. Modelul Bouck-Adelberg de transfer a cromozomului în timpul conjugării. *A* — replicarea a început la nivelul replicatorului F (*RF*); *B* — închiderea cromozomului progen este împiedecată de începutul transferului său într-o bacterie F^-.

de transfer este prima porţiune din cromozom care se replică. Pe măsură ce replica-fiică de ADN se formează, ea pătrunde în celula femelă cu ajutorul energiei libere furnizate de polimerizarea nucleotid-trifosfaţilor. Transferul este deci în mod direct pus în mişcare de procesul de replicare. Această ipoteză are trei avantaje: *1*) pornind de la premisa că factorul *F*, ca şi cromozomul, este legat prin mezozom de membrana citoplasmatică, ea lămureşte modul în care materialul susceptibil de a fi transferat „găseşte" deschiderea canalului de conjugare: contactul şi fuziunea dintre celule se fac exact la nivelul acestei legături; *2*) ea explică de ce la aceeaşi tulpină dată cromozomul este transferat totdeauna începînd cu aceeaşi origine: replicarea este iniţiată întotdeauna în acelaşi punct, acela în care repliconul este legat de membrana citoplasmatică; *3*) sugerează care este forţa care asigură transferul cromozomului: energia implicată în procesul de replicare a ADN este suficientă pentru a „împinge" în tubul de conjugare pe unul dintre cromozomii-fii, pe măsură ce sinteza lui progresează.

După un alt model, acela al lui Bouck şi Adelberg (1966), spre deosebire de celulele F^- şi F^+, la care replicarea cromozomului poate să înceapă la nivelul oricăruia dintre cei cîţiva replicatori existenţi, la celulele *Hfr*, unde factorul *F* şi cromozomul constituie un replicon unic, acest proces nu poate începe decît la nivelul replicatorului *F*, a cărui prezenţă blochează activitatea replicatorilor cromozomici. Replicarea ar progresa în sens opus faţă de locul integrării factorului *F*, iar unul dintre cei doi cromozomi-fii astfel rezultaţi nu şi-ar mai reuni extremităţile pentru a forma un inel. Capătul liber iniţial, opus extremităţii unde este localizat factorul *F*, devine originea noului cromozom şi se angajează în canalul de conjugare. După această ipoteză, transferul începe deci numai după ce replicarea cromozomului din celula donatoare s-a încheiat, atunci cînd în celula *Hfr*, pe lîngă propriul ei cromozom mai există şi o copie a acestuia care poate fi transferată.

Sexducţia sau F-ducţia (transferul mediat de factorul F′)

Tulpinile *Hfr* au uneori tendinţa să revină la starea F^+, prin reversia factorului F de la starea sa de integrare în cromozom la starea de autonomie în citoplasmă. Într-un număr mic de astfel de cazuri, se poate întîmpla ca între factorul *F* integrat şi cromozom să fi avut loc un schimb de material genetic, în sensul ca în structura factorului *F* să se fi încorporat una sau mai multe gene cromozomice din regiunile adiacente locului său de inserţie. Într-o asemenea situaţie, în cursul trecerii sale la starea autonomă, factorul episomic *F* antrenează cu sine aceste gene cu care formează o unitate de replicare şi de transfer, denumită factorul *F′*, în care segmentul uneori foarte mare de cromozom bacterian devine parte integrantă din repliconul pe care-l constituie factorul de sex. În procesul de conjugare dintre o celulă F^- şi o celulă purtătoare a factorului *F′*, celula femelă capătă nu numai calitatea de mascul, prin primirea factorului de sex, ci şi determinanţii cromozomici integraţi în acesta, ceea ce se traduce prin apariţia unor proprietăţi fenotipice noi, cum ar fi, de exemplu, fermentarea lactozei, care reprezintă „markeri" genetici (în exemplul dat lac^+), servind la punerea în evidenţă a modificării survenite în genotipul celulei „fecundate". Ia naştere astfel un tip nou de celule bacteriene care posedă un dublu caracter sexual — F^+ şi *Hfr* — de unde caracterizarea lor ca masculi intermediari. Caracterul F^+ constă în capacitatea acestor celule de a transfera prin conjugare factorul *F*, iar asemănarea cu celulele *Hfr* rezidă în marea frecvenţă cu care se produce recombinarea genelor cromozomice trans-

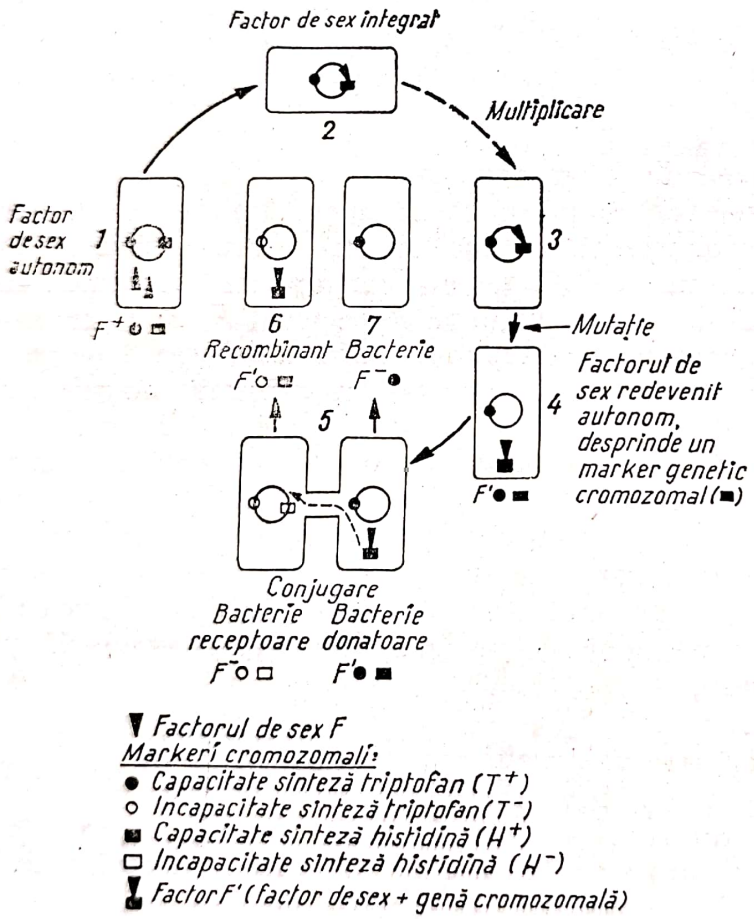


Fig. 344. Fenomenul de sexducţie la bacterii. Factorul de sex autonom (*1*) este integrat în cromozom (*2*) în apropierea unui marker genetic (H^+); după o perioadă de multiplicare normală (*3*) el revine la starea autonomă antrenînd şi markerul H^+, şi devenind astfel un factor F′ (*4*) care poate fi transmis prin conjugare la o bacterie F^- (*5*).

ferate o dată cu factorul de sex, ca urmare a similitudinii lor din punctul de vedere al secvenţei bazelor cu genele de pe cromozomul celulei receptoare. Fenomenul este similar transducţiei şi de aceea este denumit de unii autori *transducţie prin factorul F'*.

Filogenia factorului de sex la bacterii

Relaţiile şi interacţiunile dintre factorul de sex şi bacteriile care-l poartă seamănă foarte mult cu acelea dintre fagul temperat şi gazda sa bacteriană lizogenă. În ambele cazuri este vorba de aşa-numiţi *„cromozomi miniaturali"* alcătuiţi dintr-un singur tip de acid nucleic, care se dobîndesc prin infectarea celulei-gazdă, constituie un supliment de material genetic, sînt dependenţi în ceea ce priveşte replicarea lor de metabolismul celulei-gazdă şi sînt capabili de replicare autonomă în citoplasmă sau dependentă de aceea a cromozomului bacterian dacă sînt integraţi în el, în care caz pot încorpora şi antrena cu sine fragmente ale acestuia.

Exceptînd capacitatea de persistenţă extracelulară, care le lipseşte, factorii de sex — *conjugonii* în general — au toate caracteristicile virusurilor în sensul definiţiei date de L w o f f. Ei ar putea fi consideraţi, după H a y e s, ca *forme particulare de virusuri*, avînd capacitatea de a determina conjugarea bacteriilor, proces care le asigură o răspîndire foarte eficace în populaţia de celule-gazdă virtuale. Posibilitatea unui genom infectant de a pătrunde din celula donatoare direct în celula receptoare, parcurgînd un canal de conjugare care-l protejează de acţiunea nocivă a mediului extracelular, face inutilă sinteza unei capside proteice omologe aceleia a virusurilor. Relaţia de „simbioză" dintre un factor sexual primitiv şi gazda sa bacteriană ar reprezenta prototipul funcţional care a permis evoluţia organismelor spre sexualizare.

c. Recombinarea genetică

Recombinarea genetică este un proces prin care material genetic provenit din două genomuri diferite se constituie într-un genom calitativ nou, purtător al unei informaţii genetice derivată din aceea a ambelor genomuri parentale.

Materialul genetic introdus prin transfer într-o celulă bacteriană receptoare nu se poate menţine ca atare şi multiplica independent decît atunci cînd este reprezentat printr-un episom. Altminteri, numai o parte din informaţia genetică exogenă subsistă şi ea este încorporată în cea endogenă printr-un proces constînd nu dintr-o însumare, ci dintr-o substituire a informaţiei purtate de acea regiune din cromozomul receptorului care este omologă fragmentului de exogenot. După o perioadă limitată de diploidie, care de altfel este numai parţială datorită caracterului fragmentar al aportului de exogenot, între regiuni omologe ale exo- şi endogenotului se produce un schimb avînd ca rezultat integrarea unei părţi din materialul genetic străin în cromozomul celulei receptoare. Informaţia genetică totală a acestei celule se menţine deci cantitativ constantă, ea fiind numai modificată calitativ prin substituirea ei parţială cu o informaţie străină.

Fragmentele rămase neintegrate în cromozomul recombinant sînt degradate pe cale enzimatică, iar constituenţii lor sînt folosiţi în metabolismul celular.

La nivelul molecular, recombinarea genetică este echivalentă cu un schimb de secvenţe nucleotidice între regiuni omologe de pe molecula endogenă de ADN şi de pe fragmentul de ADN exogen. Rezultatul acestui schimb este integrarea secvenţei exogene în molecula de ADN, replicarea ei o dată cu aceasta şi, ca atare, transmiterea la descendenţii celulei receptoare — care alcătuiesc o clonă de recombinanţi — a unei informaţii genetice parţial modificate, ceea ce se traduce fenotipic prin apariţia unor caractere noi, majoritatea celorlalte proprietăţi ale celulei de origine rămînînd aceleaşi.

Aşadar, deşi în celula care a primit prin transfer un fragment de genom străin cantitatea de material genetic este pentru un timp mărită, la descendenţi nu se transmite decît informaţia genetică proprie stării haploide, fiindcă se poate replica numai acea parte din genomul suplimentar care a fost integrată, prin substituirea unei regiuni omologe, în cromozomul celulei receptoare. La bacterii, prin urmare, starea de diploidie este numai parţială, din cauza contribuţiei cantitativ inegale a celor două genomuri implicate în procesul de transfer genetic, şi temporară, datorită integrării exo- şi endogenotului într-o structură unică de tip haploid în urma procesului de recombinare.

Mecanismul recombinării genetice. Pentru a se explica modul în care se produce acest proces încă incomplet cunoscut, s-au emis două ipoteze denumite după modelele de acţiune pe care le propun:

1) *Modelul „rupere şi reunire" („breakage-reunion")* a fost elaborat de Messelson şi Weigle pe baza studiilor privitoare la replicarea cromozomilor recombinanţi marcaţi cu izotopii grei C^{14} şi N^{15}. În concepţia acestor cerce-

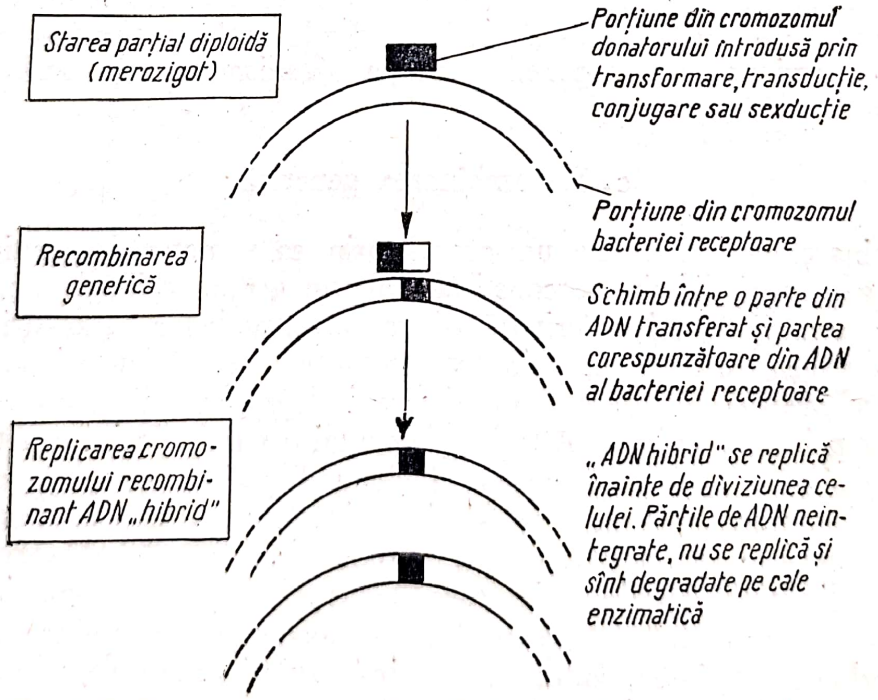


Fig. 345. Recombinarea genetică. După transfer o cantitate mică din informaţia genetică exogenă poate fi integrată în genomul celulei receptoare prin înlocuirea unei cantităţi echivalente din cromozomul acesteia (după Braun).

tători, recombinarea ar fi inițiată prin ruperea celor doi cromozomi alăturați, în puncte aproximativ oarecare dar situate la nivele similare pe ambele molecule de ADN. Fragmentele de cromozomi astfel rezultate se reunesc apoi încrucișat *(crossing-over)*, astfel încît cromozomii recombinanți provin direct din cei doi cromozomi parentali. Fenomenul ar avea loc la bacterii înaintea primei diviziuni a merozigotului. Porțiunile necomplementare care nu au fost integrate în cromozomul recombinant sînt degradate pe cale enzimatică, iar cele integrate, care au rămas monocatenare, sînt completate prin sinteză.

2) *Modelul „copierii alternative" sau al „alegerii modelului" („copy-choice")* postulează că nu ar exista nici un schimb structural de ADN între genomul receptorului și materialul genetic provenit de la donator, ci că sinteza de ADN nou în cursul procesului de replicare s-ar face folosindu-se alternativ ca matriță o catenă din ADN al receptorului și una din ADN al donatorului. O catenă nouă ar fi deci formată parte prin sinteza unui lanț de baze complementar față de catena din ADN-matriță a receptorului, parte prin „copierea" în același mod a modelului furnizat de fragmentul de ADN exogen. Ca urmare, într-una din catenele ADN nou sintetizat o secvență de nucleotide a avut ca model nu o secvență din ADN endogen, ci secvența omologă din ADN exogen.

În spiritul acestei ipoteze, cromozomii recombinanți sînt integral sintetizați *de novo* și nu rezultați din reunirea încrucișată a unor fragmente din cromozomii parentali preexistenți, așa cum o sugerează ipoteza precedentă. Cercetări efectuate cu ajutorul fagilor ADN au demonstrat însă că în cazul acestor fagi mecanismul esențial al *crossing-over*-ului, și deci al recombinării genetice, este *ruperea* și *reunirea* moleculei de ADN dublu helical.

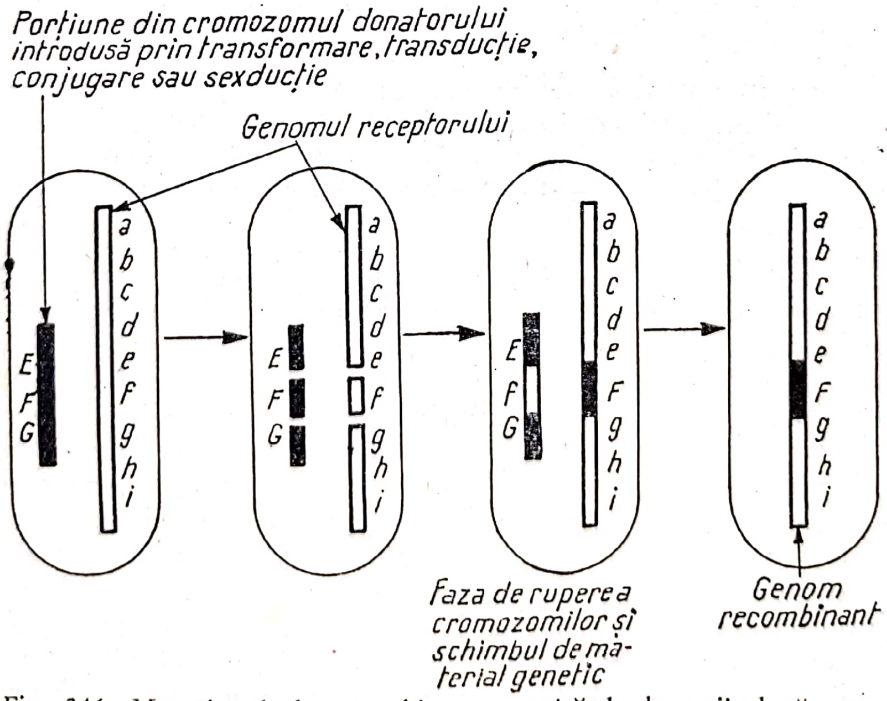


Fig. 346. Mecanismul de recombinare genetică la bacterii după modelul „rupere și reunire" (după Adelberg).

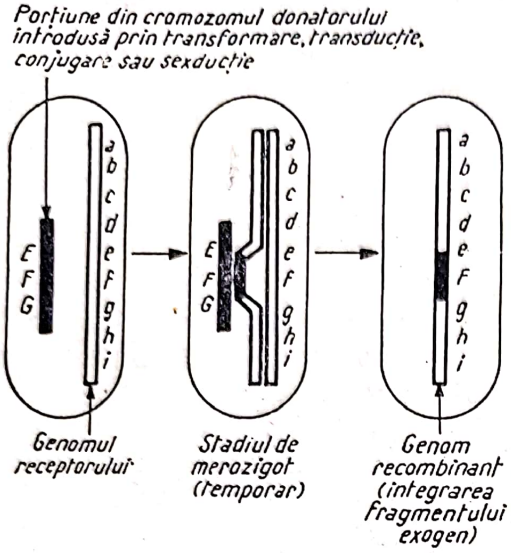


Fig. 347. Mecanismul de recombinare genetică la bacterii după modelul „copierii alternative".

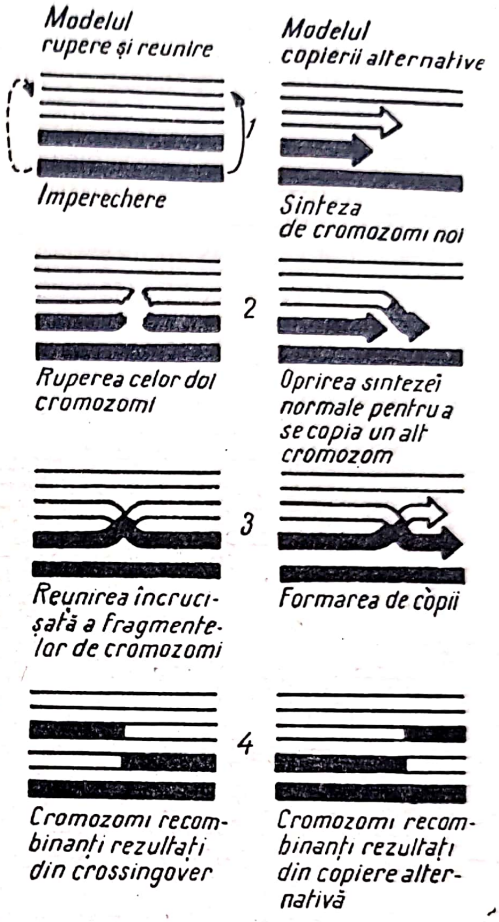
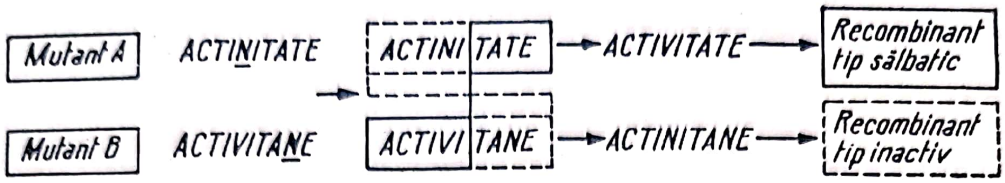


Fig. 348. Reprezentare diagramatică (*1—4*) a celor două modele generale de producere a *crossing-over*-ului (după Watson).

Recombinarea intragenică. După concepțiile geneticii clasice, care consideră gena ca unitate ultimă, indivizibilă a cromozomului, recombinarea nu poate fi decît *intergenică*. Cercetări efectuate pe microorganisme au demonstrat totuși și realitatea recombinării *intragenice*, necunoscută pînă acum la organisme superioare.

Făcîndu-se o analogie între o genă oarecare și un cuvînt cu semnificație, de exemplu cuvîntul a c t i v i t a t e, fiecare literă ar echivala cu un nucleotid sau, eventual, cu o succesiune de trei nucleotide, corespunzînd unui codon; întregul cuvînt ar reprezenta informația genetică așa-numită „cu sens", care controlează biosinteza unei enzime esențiale pentru metabolismul celular. Diferite mutații care afectează această genă alterează într-un fel sau altul sensul mesajului ei, ceea ce determină sinteza unei proteine-enzimă modificate, deci nefuncțională, astfel că mutantele sînt private de capacitatea de sinteză a enzimei respective. Dacă dintre asemenea mutante se selecționează două — *A* și *B* — purtătoare, în ceea ce privește sinteza unei enzime ,ale unor mesaje genetice lipsite de sens ca urmare a unor alterări mutaționale la nivelul aceleiași gene dar în punote diferite ale structurii ei, este posibil ca prin recombinare genetică mesajul să-și recapete sensul în genomul uneia dintre mutante, conform schiței:



Ca urmare, descendenţii celulei în care a avut loc recombinarea, şi care este aceea care a primit prin transfer de la cealaltă mutantă fragmentul de genă nealterat care restabileşte sensul informaţiei genetice — redobîndesc capacitatea de biosinteză a enzimei esenţiale pentru metabolismul lor, ceea ce înseamnă că au revenit la tipul sălbatic originar.

Concluzia cercetărilor asupra recombinării intragenice este deosebit de importantă. Din puncut de vedere al aptitudinii de recombinare, ca şi din acela al susceptibilităţii de a suferi mutaţii, *gena funcţională sau cistronul nu este o unitate indivizibilă.* Ea este alcătuită, ca în exemplul de mai sus, din *subunităţi* dispuse într-o ordine liniară, asemenea literelor dintr-un cuvînt, şi reprezentînd fiecare sediul potenţial al unei recombinări sau al unei mutaţii, de unde şi denumirea de *reconi* sau de *mutoni* dată acestor subunităţi.

19. LOCALIZAREA GENELOR PE CROMOZOM. HARTA GENETICĂ

Studiul proceselor de conjugare şi de recombinare genetică a furnizat date referitoare la localizarea genelor pe cromozom, ceea ce a făcut posibilă elaborarea unor *hărţi genetice* ale cromozomului bacterian şi chiar ale genelor. Iniţial, se considera că localizarea genelor pe cromozom ar fi întîmplătoare. Cercetări efectuate pe bacterii şi pe virusuri au demonstrat însă că genele care controlează funcţii înrudite sînt dispuse în grupuri. Această concluzie a fost posibilă numai după descoperirea compexităţii unor fenomene chimice reglate genetic. Astfel, ultimele etape ale căii de biosinteză a triptofanului implică parcurgerea a cinci trepte metabolice succesive, controlate fiecare de cîte o enzimă specifică, dintre care ultima este triptofansintetaza. Regiunea din cromozom care controlează biosinteza triptofanului cuprinde, prin urmare, cinci gene, determinanţi ai celor cinci enzime corespunzătoare treptelor metabolice ale acestei biosinteze. În mod similar, regiunea din cromozomul *E. coli* care determină capacitatea de sinteză a histidinei, regiunea considerată iniţial ca reprezentînd o singură genă, constă în realitate din 10 gene.

În ceea ce priveşte ordinea genelor în cadrul unui asemenea grup sau set de determinanţi, se consideră că, de obicei, ea ar fi identică aceleia în care enzimele corespunzătoare intervin în calea biosintetică respectivă. Există însă şi excepţii (fig. 349), cum ar fi aceea întîlnită în cazul biosintezei histidinei în al cărei set de determinanţi primele două enzime implicate în procesul de sinteză sînt situate la extremităţile regiunii cromozomice a histidinei.

Procesele de degradare implică şi ele o succesiune de reacţii chimice catalizate fiecare de cîte o enzimă, deci sînt controlate, ca şi procesele de biosinteză,

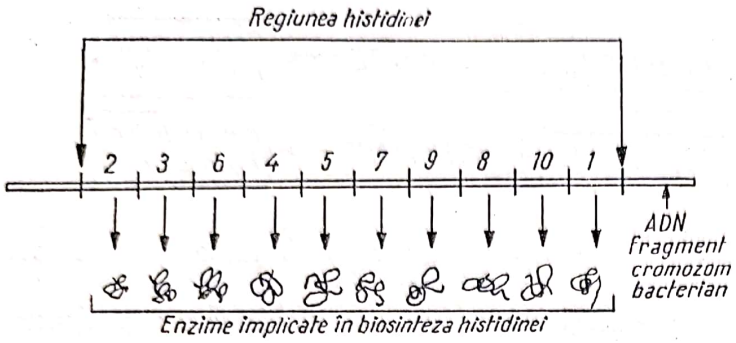


Fig. 349. Aşezarea genelor implicate în sinteza histidinei în cromozomul bacteriei *S. typhimurium*.

de un grup de gene dispuse, în general, în ordinea corespunzătoare intrării în acţiune a fiecărei enzime.

Stabilirea poziţiei relative a diferitelor gene pe cromozomul bacterian sau viral şi elaborarea unor hărţi genetice s-au făcut în ultimii ani folosindu-se metoda *conjugării întrerupte* (Jacob, Wollman şi Hayes) şi determinarea frecvenţei de recombinare genetică.

Prima metodă utilizează *agitarea mecanică a suspensiei de celule conjugante pentru ruperea canalului de conjugare sau a pililor de sex*, ceea ce are ca rezultat oprirea transferului unidirecţional al cromozomului de la bacteria *Hfr* donatoare la celula F^- receptoare. Întrucît celulele astfel separate rămîn viabile, la recombinanţii din descendenţa merozigotului se poate decela apariţia proprietăţilor noi — a „markerilor" genetici — corespunzînd determinanţilor transferaţi de la donator la receptor. Întreruperea la diferite intervale determinate a procesului de conjugare permite să se stabilească timpul necesar pentru ca un „marker" genetic al bacteriei *Hfr* să fie transferat bacteriei receptoare, la care el se exprimă fenotipic după recombinare.

Ţinînd seama de faptul că transferul materialului cromozomic se face cu o viteză constantă şi cu o orientare specifică, intervalul de timp dintre trecerea în celula receptoare a doi „markeri" genetici reprezintă o măsură a distanţei dintre genele corespunzătoare de pe cromozomul donatorului. Pe baza acestei relaţii s-a trasat o hartă genetică reprezentînd ordinea în care sediile (sau *„locii"*) determinanţilor a diferiţi „markeri" genetici sînt situate pe cromozomul celulei mascule şi distanţele care le separă (lungimea acestor distanţe fiind direct proporţională cu timpul necesar pentru pătrunderea fiecărei gene în celula femelă). O asemenea reprezentare, echivalentă unei hărţi citologice, ar putea fi asemănată cu o „hartă feroviară" în care distanţa dintre două staţii ar corespunde unei gene, dar în care această distanţă ar fi măsurată nu în unităţi de lungime, ci în funcţie de timpul necesar unui tren cu viteză constantă pentru a ajunge de la o staţie la alta. Lungimea genelor reprezentate pe hartă este variabilă, ceea ce sugerează o diversitate corespunzătoare a mărimii moleculare a produşilor sintetizaţi sub controlul lor.

A doua metodă de stabilire a hărţilor genetice la bacterii şi la virusuri se bazează pe *folosirea experienţelor de recombinare*.

Studiul procesului de conjugare între bacterii de tip *Hfr* şi F^- a arătat că ordinea de succesiune a „markerilor" pe cromozom poate fi stabilită nu numai

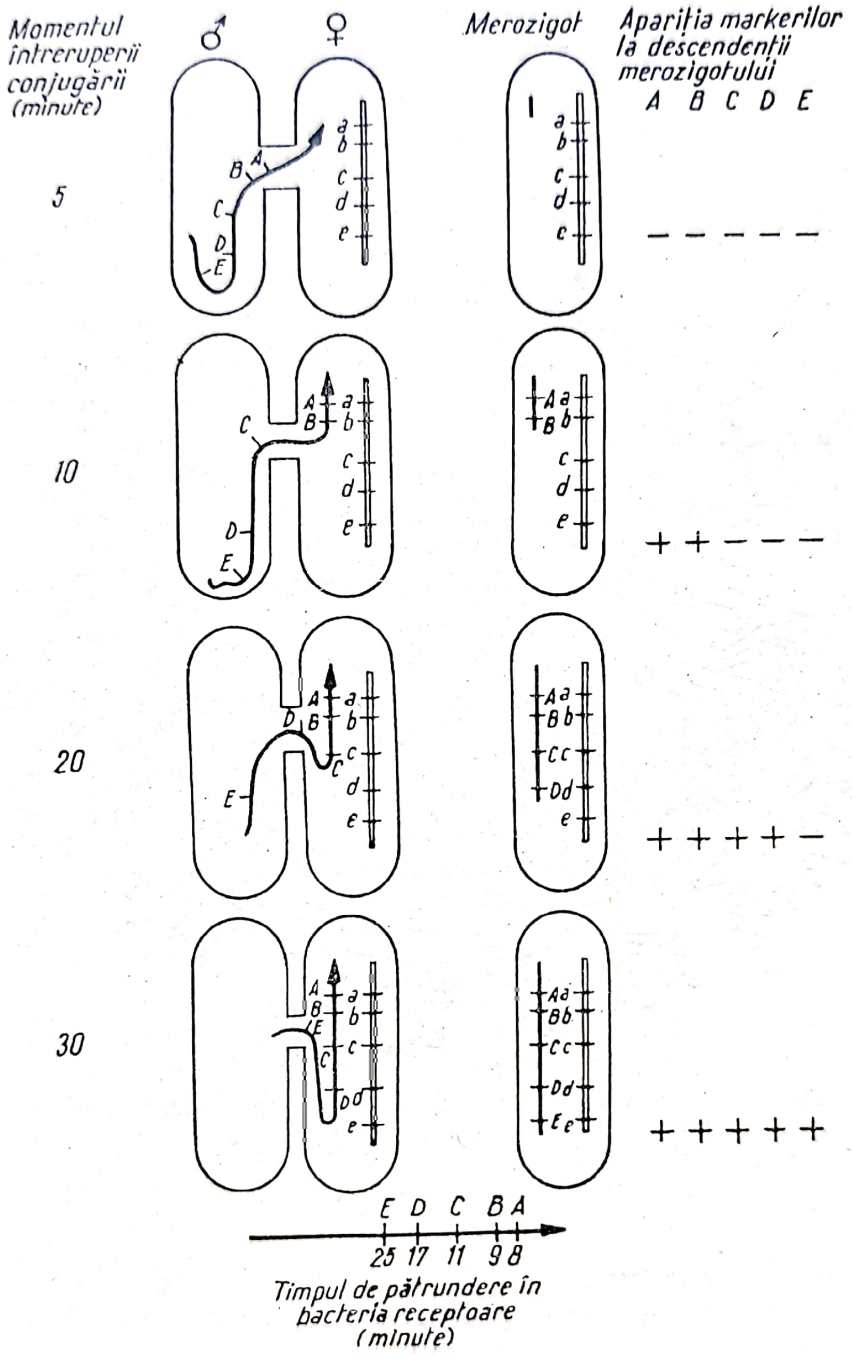


Fig. 350. Reprezentare diagramatică a unei experiențe de conjugare întreruptă la *E. coli* — utilizată pentru întocmirea hărților genetice ale cromozomului bacterian.

prin determinarea momentului pătrunderii lor în celula receptoare, ci și prin frecvența recombinării lor cu cromozomul acesteia.

Astfel, spre exemplu, „markerul" *A* care, fiind foarte apropiat de „originea" cromozomului, pătrunde cel dintîi în celula receptoare după 10′ de contact, are o frecvență de recombinare de 40%, ceea ce înseamnă că numărul recom-

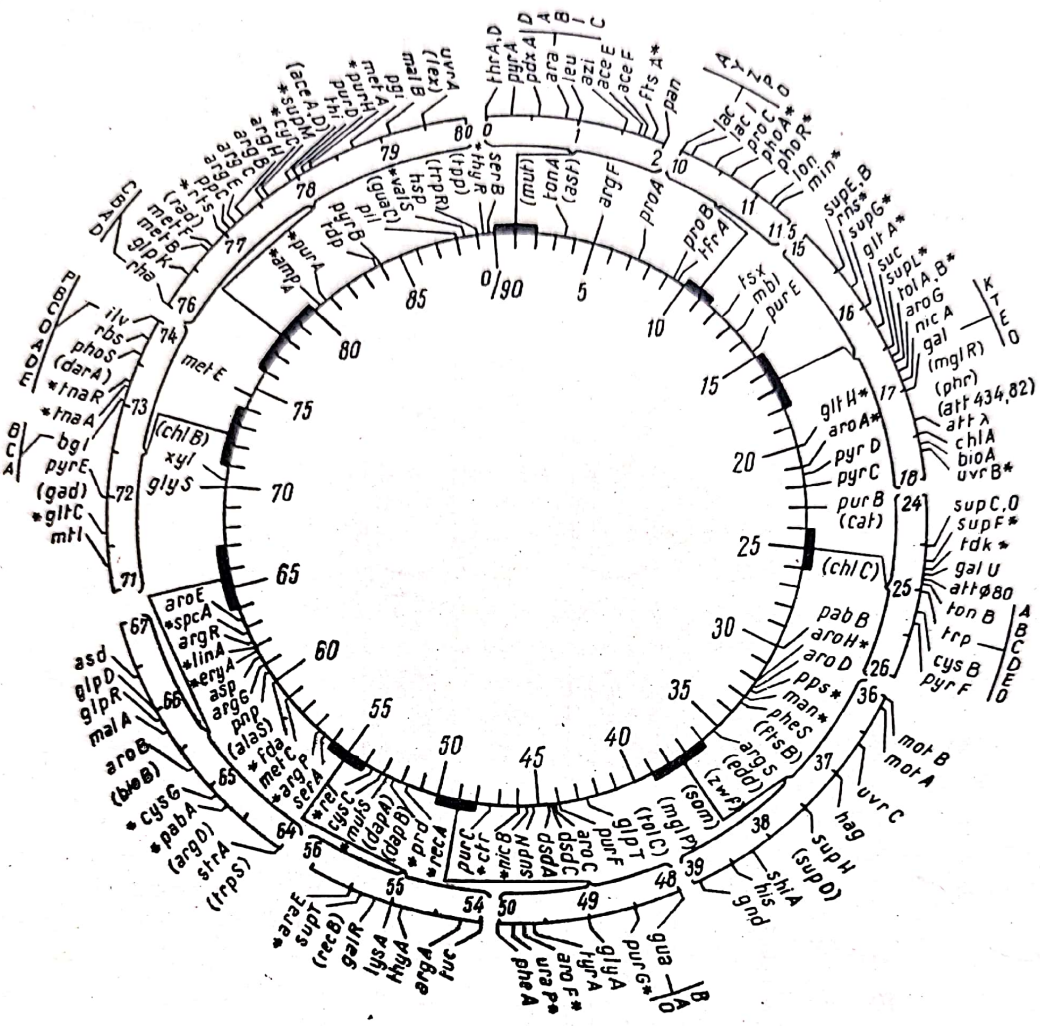


Fig. 351. Harta genetică a cromozomului *E. coli:* cercul intern cuprinde întreaga succesiune a zonelor diferenţiate şi timpul necesar (0—90′) pentru transferul unui anumit marker genetic în cursul conjugării. Pe arcurile de cerc exterioare sînt reprezentate la o scară mărită anumite porţiuni ale hărţii (după Taylor).

binanţilor care primesc caracterul *A* reprezintă 40% din numărul celulelor parentale H*fr* care s-au împerecheat cu celule F^-. „Markerul" *B*, mai distanţat de „originea" cromozomului, care pătrunde după 15′, are o frecvenţă de recombinare de 20%, în timp ce ultimul „marker", situat la capătul distal al cromozomului, unde este înserat şi factorul de sex, are o frecvenţă de recombinare de numai 0,05%.

S-a demonstrat că diverşii „markeri" de pe cromozom nu pot fi separaţi în vederea recombinării decît dacă între ei este posibil un *crossing-over* şi că, pe de altă parte, unii dintre ei au o tendinţă foarte marcată de a rămîne legaţi împreună (*linkage*) în cursul procesului de recombinare. Cu cît doi markeri sînt mai apropiaţi ca localizare pe cromozom, cu atît există mai puţine şanse

ca între ei să se producă un *crossing-over* care să îi separe şi cu atît este mai mare posibilitatea ca ei să fie transmişi împreună. Demonstrarea posibilităţii ca mai mulţi markeri să rămînă legaţi între ei a permis stabilirea poziţiei lor relative pe cromozom.

a. Harta genetică a fagilor

Folosind experienţe de recombinare a fagilor, Benzer, Edgar şi Epstein au elaborat o hartă genetică a fagului T_4 pe care au căutat să localizeze cît mai multe gene ale căror funcţii specifice fuseseră în prealabil identificate. Ei au pornit de la premisa că genomul fagului T_4, al cărui ADN conţine circa 200 000 perechi de baze, ar fi reprezentat prin cîteva sute de gene răspunzătoare de sinteza a cîteva sute de proteine în celula bacteriană gazdă. Studiile de acest gen se realizează infectînd o celulă bacteriană cu doi sau mai mulţi fagi mutanţi, genetic distincţi. Genomurile virale se replică în bacteria-gazdă şi, atîta timp cît nu sînt acoperite cu capsidă, între ele se pot produce fenomene de *crossing-over*.

Pentru identificarea unei gene fagice prin „citirea" funcţiei specifice corespunzătoare, s-a folosit inducţia unei mutaţii care, în funcţie de „eroarea" moleculară pe care o determină, are ca rezultat fie un *non-sens* genetic, de unde pierderea totală a capacităţii de a determina în celula-gazdă sinteza unei anumite proteine-enzime, fie un aşa-numit *fals-sens* genetic, implicînd sinteza unei proteine modificate. Comparîndu-se comportarea tulpinilor fagice mutante cu aceea a tipului sălbatic originar, se poate deduce funcţia genei afectate de mutaţie.

Localizarea pe hartă a genelor astfel identificate s-a făcut prin experienţe de recombinare genetică în care mai mulţi fagi mutanţi, cu defecte genetice corespunzînd unor mutaţii la nivelul a 56 de gene diferite, au fost amestecaţi în vederea infectării unei aceleiaşi celule bacteriene cu corpusculi fagici deosebiţi din punct de vedere genetic. În cursul replicării, în celula bacteriană a ADN provenit de la asemenea bacteriofagi, se produc recombinări de material genetic ca urmare a ruperii moleculelor de ADN fagic, urmată de reasocierea unor fragmente provenite de la doi fagi mutanţi diferiţi, pentru a forma molecule noi de ADN „hibrid". În felul acesta, în funcţie de originea fragmentelor de material genetic între care s-a produs recombinarea, particulele progene de fag pot fi de tipul *sălbatic originar*, dacă genomul lor a rezultat prin recombinarea unor fragmente de ADN nealterate prin mutaţie, sau pot fi *dublu-mutante*, dacă în genomul lor s-au asociat două fragmente de ADN afectate de acţiunea mutagenă la nivelul unor „loci" diferiţi.

Frecvenţa recombinării depinde de poziţia pe cromozomul viral a caracterelor folosite ca „markeri". Datorită acestui fapt, încrucişarea între anumite perechi de „markeri" are ca rezultat formarea de fagi recombinanţi în proporţie de aproape 50%, alteori frecvenţa recombinării este mai mică şi, în sfîrşit, în alte cazuri, procesul de recombinare nu poate avea loc. Ca regulă generală, cu cît două gene sînt situate mai departe una de alta pe cromozomul

viral, cu atît procesul de *crossing-over* survine mai uşor, deci frecvenţa recombinării este mai mare. În funcţie de frecvenţa recombinării se poate, prin urmare, aprecia poziţia relativă a genelor pe cromozom.

Harta cromozomică astfel obţinută poate fi trasată sub forma unui cerc, care reprezintă molecula de ADN, deşi pe microelectronografii ADN al fagului T_4 apare ca avînd extremităţile libere, capetele *a* şi *z* ale moleculei fiind însă, probabil, foarte apropiate. Cele mai multe gene sînt foarte mici (cam 1% din lungimea cromozomului), altele în schimb sînt foarte mari şi este cert că nu toate genele acestui fag au fost descoperite. Peste 40 din cele identificate

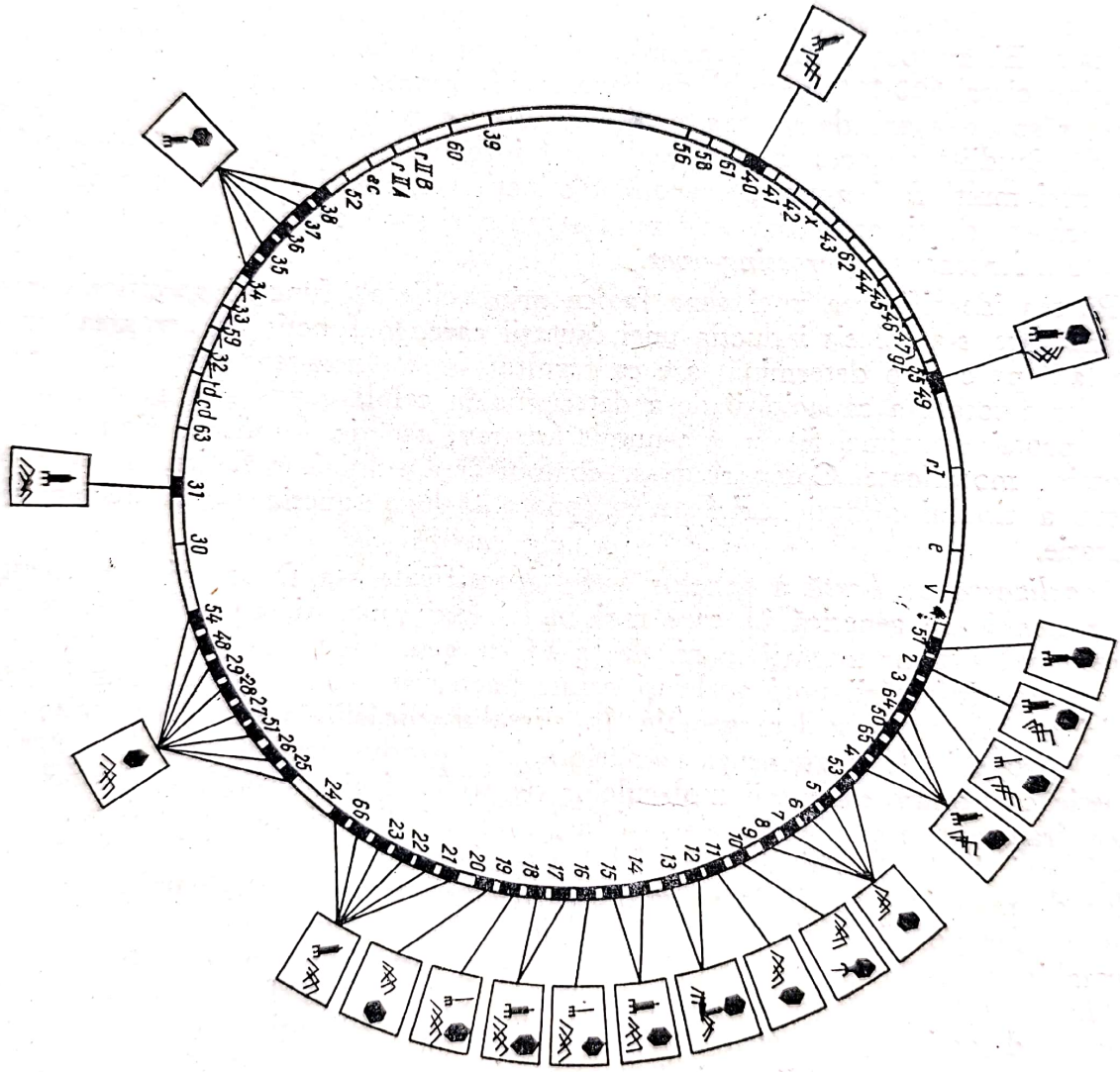


Fig. 352. Harta genetică a fagului T_4 indicînd poziţia relativă a peste 75 gene. Segmentele negre ale cercului corespunzător genomului indică gene cu funcţii morfogenetice. Structurile care lipsesc în dreptunghiurile exterioare cercului se formează sub acţiunea genelor respective, dar nu mai apar la mutantele defective cu alterări la nivelul acestor gene; structurile figurate în dreptunghiuri sînt singurele care se formează la mutantele defective corespunzătoare (după Wood).

au rol în morfogeneză, determinînd formarea şi asamblarea componentelor corpuscului viral, iar restul dirijează funcţii legate de reglarea activităţii metabolice şi de liza celulei-gazdă. Mutantele defective au toate funcţiile virionului normal, cu excepţia aceleia care era determinată de gena afectată prin mutaţie.

b. Hărţile genelor

Cercetările bazate pe *recombinare* au permis o analiză genetică mult mai fină, care a dat posibilitatea să se traseze chiar *„hărţi ale genelor"*. În această privinţă s-au obţinut rezultate interesante prin analiza genetică a două gene adiacente de pe cromozomul fagului T_4, genele *A* şi *B* de care depinde durata ciclului de viaţă, deci mărimea „plajelor" acestui fag.

Fagul T_4 normal, de tip sălbatic, are capacitatea de a infecta atît tulpina *B*, cît şi tulpina *K*12 (λ) de *Escherichia coli*, la care determină liza în cîteva ore. Prin mutaţii la nivelul genelor adiacente *A* şi *B* se obţin mutanţi de tipul *r*II (*r*-rapid, II pentru diferenţierea de I, de asemenea mutant prin caracterul *r*) denumiţi *r*II*A* şi *r*II*B* care au un ciclu de viaţă mult mai scurt decît al formei sălbatice, datorită căruia se multiplică mai rapid şi, ca atare, produc „plaje" mult mai mari. Prin acest caracter, mutantele sînt uşor de diferenţiat de tipul sălbatic. În plus, ele pierd capacitatea de a infecta tulpina *K*12, rămînînd active numai asupra tulpinii *B*.

Pentru recombinări s-au izolat şi folosit peste 2 000 mutante diferite obţinute prin mutaţii limitate, cel mai adesea punctiforme, la nivelul genelor adiacente *A* şi *B*. O încrucişare tipică s-a realizat prin infectarea tulpinii *B* de *E. coli* cu două tulpini mutante de fag T_4, care purtau fiecare cîte o mutaţie deosebită dar produsă la nivelul unei aceleiaşi gene, adică două mutante distincte, dar fiind ambele sau de tip *r*II*A* sau de tip *r*II*B*.

Analiza fagilor progeni arată că se pot forma fagi avînd genotipuri de *tip parental* (mutanţi fie *r*II*A*, fie *r*II*B*), fagi cu caracter de dublu mutant şi fagi de *tip sălbatic* (T_4 normal). Pentru decelarea acestui ultim tip de fagi recombinanţi se face dispersarea fagilor progeni pe o cultură de *E coli K12* care nu este sensibilă decît faţă de fagul de tip sălbatic. Deci, dacă pe o cultură de *E. coli K*12, inoculată cu fagi progeni proveniţi dintr-o recombinare genetică între două mutante *r*II diferite, apar „plaje" de liză, aceasta indică prezenţa unor recombinanţi care au reconstituit tipul sălbatic. În felul acesta, poate fi detectată chiar şi numai o particulă recombinantă de tip sălbatic pentru 10^6 fagi progeni inoculaţi.

O asemenea comportare a acestor fagi progeni nu se poate explica decît prin producerea unor recombinări intragenice în cursul replicării ADN fagic în celula bacteriană gazdă de tip *B*. Într-adevăr, întrucît cei doi fagi au suferit mutaţiile la nivelul aceleiaşi gene, recombinarea intergenică nu poate avea ca rezultat reconstituirea tipului sălbatic, deoarece recombinanţii ar rămîne oricum în acest caz purtători ai genei mutante.

Dacă însă recombinarea este de tip intragenic, adică operează la nivelul unor segmente ale genelor omologe mutante, ea poate reuni fragmentele neal-

terate ale acestor gene care au suferit mutaţii în puncte diferite şi astfel este perfect posibilă reconstituirea unei gene normale, nemutante, care restituie recombinanţilor caracterul originar al tulpinii sălbatice pierdut prin mutaţie.

Analiza rezultatelor obţinute din astfel de experienţe a mai dovedit existenţa unui spectru larg de valori ale frecvenţei de recombinare, ca şi în cazul încrucişărilor între genomuri cu mutaţii situate pe gene diferite. Această distribuţie a valorilor frecvenţei de recombinare arată că sub acţiunea unui anumit agent mutagen unele mutaţii apar mai frecvent decît altele de la nivelul aceleiaşi gene, de unde reiese că porţiunile corespunzătoare de genă sînt mai apropiate între ele decît de cele mai rar afectate de acţiunea mutagenului. Pe această

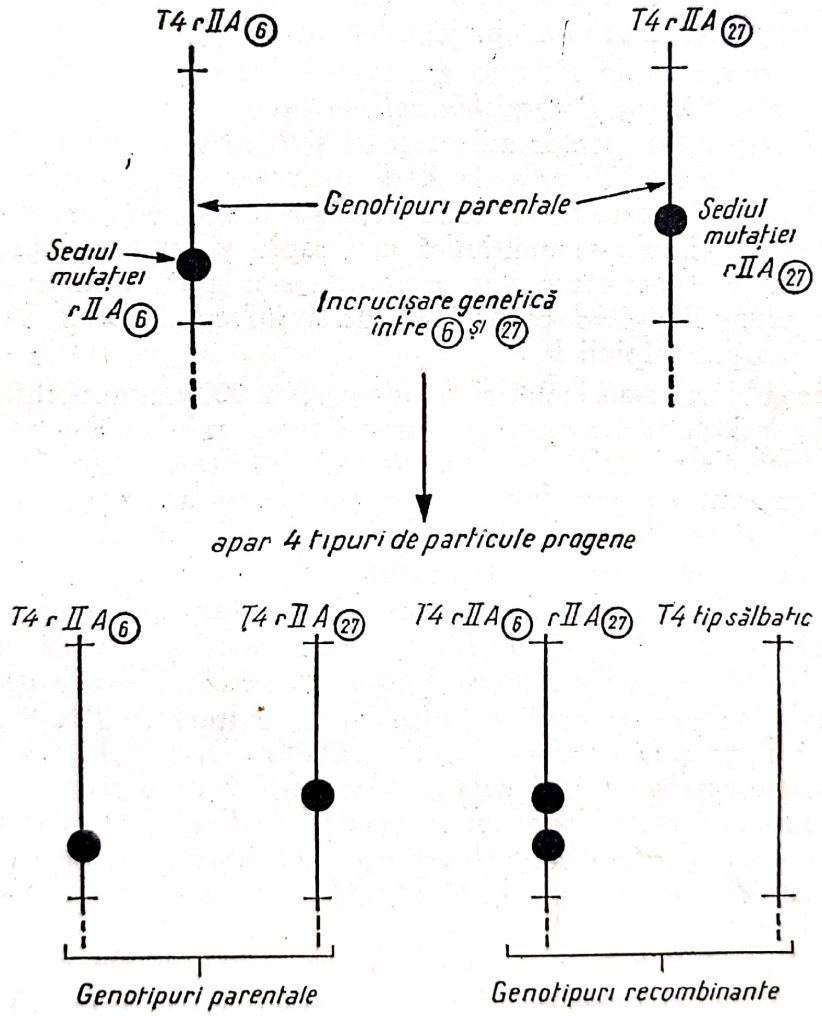


Fig. 353. Demonstrarea recombinării intragenice cu ajutorul mutantelor de tip *r* în regiunea II a fagului T_4. Din încrucişarea genetică a două mutante ale aceleaşi gene, dar la nivelul a două locusuri diferite (6 şi 27) rezultă particule progene de tip parental, particule recombinante care cumulează cele două mutaţii şi particule recombinante de tip sălbatic, la care s-a reconstituit genomul originar (după Watson).

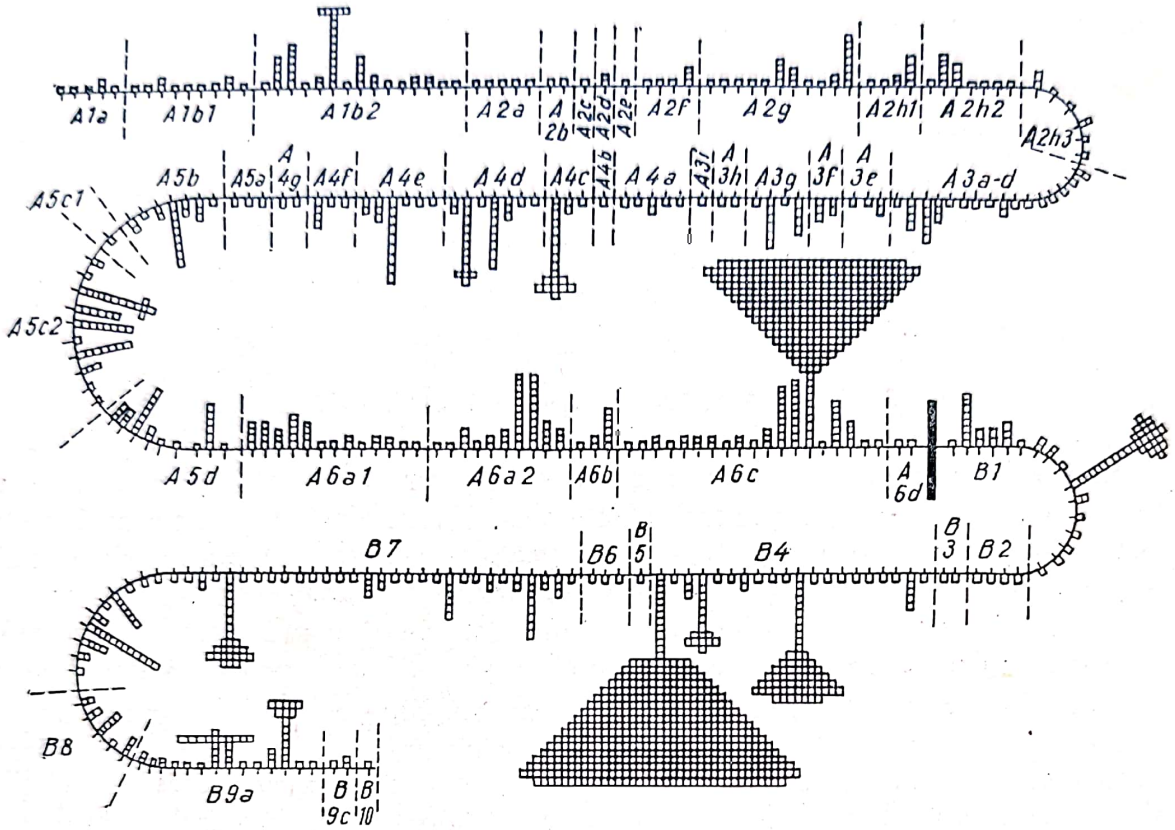


Fig. 354. Harta genelor *r*II*A* și *r*II*B* ale fagului T_4. Fiecare pătrat corespunde unui „loc" pe cromozomul fagic, capabil să sufere o mutație individuală. Unele regiuni, așa-numitele „pete calde" (*A6c, B4* etc.), suferă mutații mult mai frecvent decît altele (după Benzer).

bază s-au putut construi adevărate hărți genetice ale celor două gene mutante *r*II. Aceste hărți ilustrează structura liniară a genelor *r*II*A* și *r*II*B*, alcătuite dintr-o secvență de aproximativ 1 000—1 500 de locuri potențial susceptibile de mutație (*mutable sites*). Majoritatea mutațiilor de acest tip sînt punctiforme. Ca urmare, genele în care au survenit astfel de mutații pot reveni la tipul originar sălbatic dacă suferă o a doua mutație *(reverse mutation)* la același nivel genic ca și prima mutație. Mutațiile care produc pierderea (sau deleția) unor fracțiuni importante din structura regiunii *r*II sînt *ireversibile*, aceste fracțiuni nemaiputînd fi reconstituite printr-o altă mutație, pentru ca regiunea genică respectivă să revină la structura normală.

În concluzie, analiza hărților genetice permite o definire mai adecvată a genei ca *o mică regiune cromozomală răspunzătoare de formarea unui produs celular specific, regiune alcătuită dintr-o secvență liniară de unități potențial-susceptibile de mutație* (*mutable sites*), fiecare dintre aceste unități putînd exista în mai multe forme alternative și între care se pot produce procese de *crossing-over* (W a t s o n).

NOŢIUNI DE ECOLOGIE MICROBIANĂ

1. RĂSPÎNDIREA MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

Lumea microorganismelor este caracterizată printr-o mare diversitate de forme, structură şi potenţialităţi biochimice. Ea reflectă într-o măsură mult mai mare decît aceea a plantelor şi animalelor superioare rolul variabilităţii şi al selecţiei naturale în determinarea capacităţii de adaptare a organismelor la condiţii de viaţă dintre cele mai diferite. Ca urmare a proceselor de evoluţie au apărut microorganisme care sînt capabile să folosească pentru metabolismul lor azotul molecular, sulful, bioxidul de carbon, hidrocarburile, cresolii, acizii etc., sau să suporte condiţii neobişnuite de temperatură, salinitate, presiune hidrostatică etc. Aşa se explică de ce în locurile cele mai puţin accesibile vieţii, şi de aceea slab locuite, cum sînt fundurile oceanelor, izvoarele sulfuroase termale, mările arctice, rocile şi zăcămintele subterane, minele, vîrfurile munţilor, deşerturile etc., se găsesc totuşi microorganisme care uneori se înmulţesc destul de intens. În asemenea cazuri, adaptarea este atît de strictă, încît dacă sînt scoase din mediul lor natural şi trecute brusc în medii artificiale, celulele microbiene uneori nu se pot acomoda şi mor.

Microorganismele sînt extrem de răspîndite în natură. Ele au fost găsite din abundenţă pretutindeni unde au fost căutate: în sol, în ape, în aer, pe corpul altor fiinţe, în unele alimente, în substanţele organice vegetale şi animale în curs de descompunere, în organismul uman, animal şi vegetal.

În ceea ce priveşte răspîndirea pe verticală în cazul bacteriilor, de exemplu, ea este de asemenea neobişnuit de largă în raport cu a altor vieţuitoare. Cu ajutorul unor sonde speciale, ele au fost detectate în atmosferă la înălţimi de 12 000 m, iar în adîncimea mărilor şi a oceanelor pînă la 10 000 m.

Într-un cuvînt, microorganismele sînt prezente oriunde există condiţii de viaţă corespunzătoare, chiar la nivel minim (hrană asimilabilă, ca şi temperatură, umiditate şi *p*H adecvate), sau acolo unde condiţiile de mediu permit apariţia unor forme de rezistenţă care asigură o supravieţuire îndelungată în condiţii nefavorabile. Prezenţa anumitor microorganisme într-un mediu poate fi însă discontinuă în timp, deoarece, în natură, condiţiile care permit persistenţa prin multiplicare a unei anumite specii microbiene pot să apară şi să dispară, fie cu regularitate, ciclic, fie în mod neregulat. Astfel, microorganismele nu trăiesc în mod curent la altitudini foarte ridicate sau la adîncimi

prea mari în pămînt şi nici în ţesuturile vegetale şi animale normale, care nu au suferit agresiuni mecanice sau toxice.

Spre deosebire de organismele superioare a căror distribuţie în natură este supusă unor restricţii determinate de factori istorici, geografici şi geologici, microorganismele sînt puţin influenţate de aceşti factori în ceea ce priveşte răspîndirea lor. Aceasta se datoreşte, pe de o parte, unor caracteristici biologice comune tuturor microorganismelor, şi anume dimensiunile foarte mici ale acestor organisme unicelulare, abundenţa excepţională a populaţiilor lor şi capacitatea lor de multiplicare foarte rapidă după colonizarea unui anumit teritoriu. Pe de altă parte, multe specii de microorganisme dispun de adaptări structurale şi fiziologice adecvate mediului lor natural de trai, ca de exemplu: spori şi chişti rezistenţi, mecanisme de dispersie a formelor de rezistenţă, locomoţia rapidă a unor celule cu ajutorul cililor şi flagelilor, foto- şi chimiotactism, eliberare de toxine şi de substanţe antibiotice, viabilitatea uneori remarcabilă chiar a formelor vegetative etc.

În sfîrşit, la uniformizarea răspîndirii microorganismelor în natură contribuie şi intervenţia a trei factori ai ambianţei, şi anume curenţii de aer, curenţii marini şi animalele migratoare.

Distribuţia geografică a microorganismelor este relativ necaracteristică, în sensul că, aproximativ aceleaşi microorganisme pot fi găsite în diferite regiuni ale globului, fără să se poată vorbi în general de specii caracteristice unei anumite regiuni geografice. În cadrul uniformităţii generale de răspîndire, există desigur diferenţe în ceea ce priveşte speciile microbiene şi, mai ales, numărul lor relativ şi absolut, în funcţie de particularităţile unui anumit mediu. De exemplu, în lacurile sărate microorganismele *halofile* predomină faţă de restul microflorei, în apele termale se găsesc microorganisme *termofile* şi *termotolerante* care lipsesc în izvoarele reci, iar în regiunile polare şi în adîncul oceanelor, unde temperatura rămîne tot timpul coborîtă, trăiesc numai bacterii *psichrofile*.

În mediile naturale, caracterizate prin condiţii dificile care acţionează ca factori de selecţie, microorganismele ajung uneori să constituie *culturi pure*, în sensul că întreaga populaţie microbiană poate să aparţină unei singure specii. Spre exemplu, populaţia de alge din gheţari şi zăpezi ca şi din unele izvoare termale poate fi alcătuită dintr-o specie unică. În mod similar, unele izvoare sulfuroase pot fi populate de o singură specie bacteriană.

În mediile naturale bogate în substanţe nutritive variate, deci mai puţin selective, microflora este mult mai abundentă şi mai eterogenă, fiind alcătuită dintr-un număr mare de specii, care trăiesc în *asociaţii* mai mult sau mai puţin strînse. În general, asocierile dintre microorganisme în natură nu au un caracter constant, ci sînt temporare şi accidentale, fiecare dintre speciile componente putînd să trăiască şi separat.

Cercetările mai noi (Brock, Jones, Griffith etc.) au arătat însă că şi în mediile cu caracter neselectiv microorganismele apar adeseori în culturi pure, deoarece de obicei ele se grupează în microcolonii — separate de coloniile altor specii din habitat. De aceea, diversitatea şi eterogeneitatea puse în lumină de investigaţiile efectuate asupra unor probe mari, dispar atunci cînd microorganismele sînt studiate în microhabitatul lor natural.

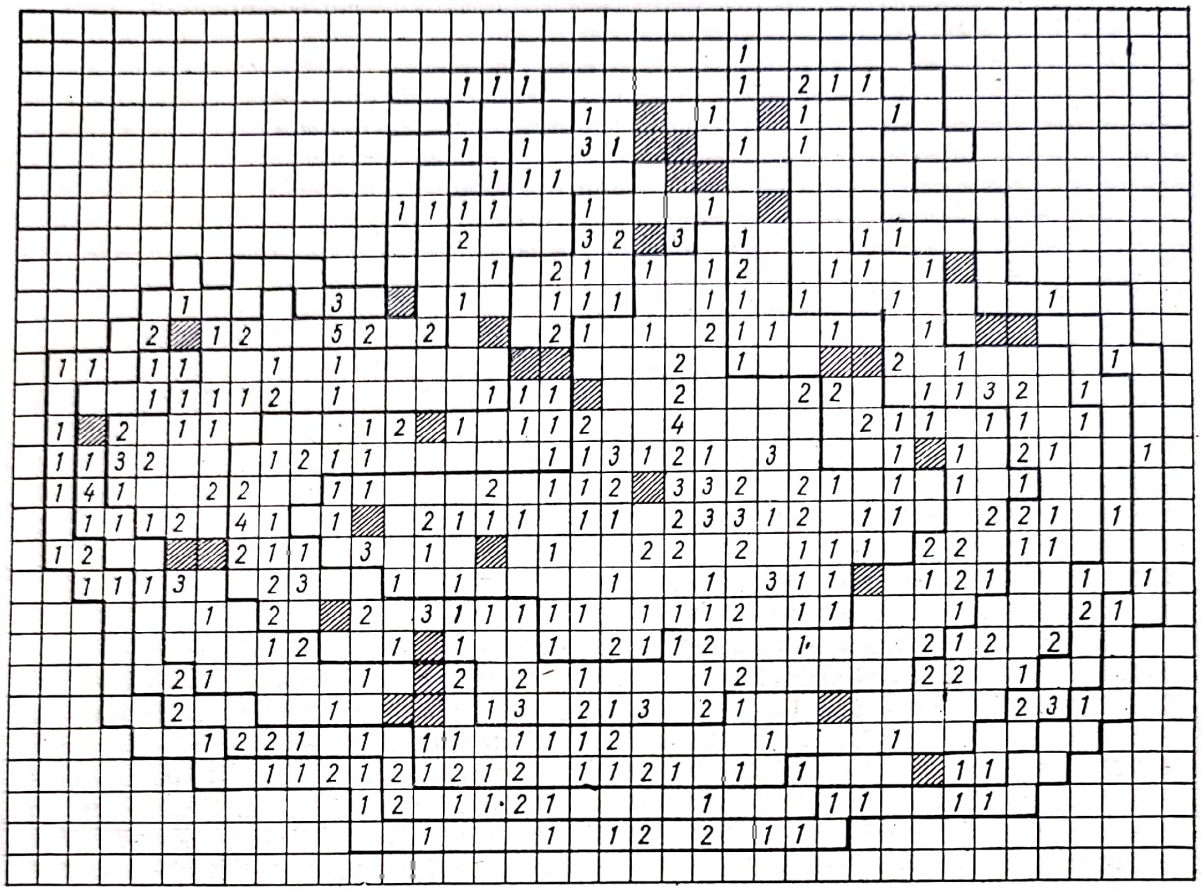


Fig. 355. Harta unei secţiuni printr-un grăunte de sol arătînd distribuţia coloniilor bacteriene (după Jones). Cifrele indică numărul de colonii în fiecare pătrat care corespunde unei zone de 70 μ. Zonele haşurat corespund spaţiilor fără sol sau cu detritusuri care au împiedicat numărarea. Reprezentarea demonstrează că bacteriile trăiesc în microhabitaturi care conţin fie o singură specie fie mai multe specii diferite.

Exceptînd cazul microorganismelor fixate în mod permanent pe un anumit substrat (rocă, plantă, animal), *habitatul* microorganismelor, adică locul din natură în care ele se înmulţesc în mod normal, este greu de delimitat. În afară de faptul că celulele mobile se deplasează activ prin propriile lor forţe, toate microorganismele libere sînt deplasate de curenţi de aer, de curenţii din apă şi de valuri, astfel încît la un moment dat pot fi concentrate într-o regiune microorganisme care de fapt cresc în locuri foarte diferite. Ca urmare, prezenţa unor microorganisme într-o anumită zonă poate avea două explicaţii: ele fac parte din flora autohtonă, indigenă, caracteristică locului respectiv sau provin din altă regiune, sînt deci *alohtone*, adică străine şi introduse în mod accidental.

Tipul de hrană are o importanţă foarte mare în dezvoltarea populaţiilor microbiene. În mod obişnuit, hrana microorganismelor este reprezentată în natură de resturi vegetale ori animale sau de produşii de metabolism ai unor organisme. Aceste alimente pot ajunge să fie disponibile în cantităţi mici şi în mod discontinuu. În asemenea împrejurări, în special atunci cînd ecosiste-

mul microbian este bazat pe utilizarea unor resurse nutritive comune, el va avea dimensiuni mici, ocupînd numai un *microhabitat*, şi uneori o durată scurtă. În cazurile în care, sub raportul condiţiilor de hrană pe care le oferă, mediul este relativ uniform pe suprafeţe mari, aşa cum sînt marile rezervoare de apă, habitatul microbian poate fi extensiv şi include organisme atît vegetale cît şi animale. În funcţie de disponibilităţile de hrană ale habitatului lor, ecosistemele microbiene au diferite grade de complexitate, de la comunităţi simple cu o singură specie dominantă la asociaţii complexe şi eterogene. În acest din urmă caz se observă frecvent fenomenul de succesiune a diferitelor grupe fiziologice de microorganisme, determinat de faptul că un aliment primar este folosit de un anumit tip de bacterii cu producerea de substanţe care, la rîndul lor, servesc ca aliment pentru alte specii bacteriene.

a. Microflora apelor

Bogăţia în microorganisme a apelor este variabilă în funcţie de caracteristicile lor fizico-chimice. În general, apele din natură sînt rareori absolut sterile, şi chiar acelea ale izvoarelor termale pot fi populate de un număr mic de specii termofile.

După Brock, majoritatea bacteriilor din apele de suprafaţă nu trăiesc liber, ci sînt asociate cu planctonul şi detritusurile organice. Cele libere ar fi rareori autohtone şi s-ar găsi de obicei în drum dintr-un loc în altul, apa jucînd, ca şi aerul, un important rol de mijloc de dispersie.

Circulaţia microorganismelor în ape este asigurată, pentru distanţele mici, de mişcarea lor activă prin cili şi flageli, iar pentru distanţele mari prin transportul lor pasiv o dată cu mişcarea apei datorită undelor şi curenţilor; în acelaşi timp, curenţii verticali se opun sedimentării microorganismelor.

Cea mai abundentă şi mai variată microfloră se întîlneşte în apele de suprafaţă (rîuri, lacuri, mări) care conţin cantităţi relativ mari de substanţe organice provenind de la flora şi fauna proprie şi care, în plus, sînt expuse contaminării cu microorganisme din sol sau cu ape reziduale bogate în microorganisme şi în substanţă organică, deversate de la nivelul comunităţilor umane riverane. Chiar apele saline şi cele alcaline au o microfloră bogată, care poate fi caracteristică pentru tipul de apă respectiv.

Microorganismele prezente în condiţii naturale în ape constituie microflora lor normală, care are un caracter permanent şi este formată în primul rînd din germeni cromogeni tipici pentru mediul acvatic (coci ca *Sarcina lutea, S. aurantiaca* şi bacili ca *Serratia marcescens, Flavobacterium aurantiacum, Chromobacterium violaceum, Pseudomonas fluorescens*) şi din diferiţi germeni din sol. Apele de suprafaţă — în care trăiesc numeroase plante şi animale — au şi o microfloră specializată, capabilă să distrugă ţesuturile acestor organisme după moarte, reprezentată de microorganisme *celulozolitice, chitinolitice, amonificatoare* etc.

Apele deschise, în special rîurile, pot fi contaminate accidental sau periodic, cu diferite microorganisme patogene provenite atît din dejecţii, produse patologice şi cadavre ale animalelor din fauna proprie, cît şi din apele reziduale

Fig. 356. Văl bacterian *(neuston)*, format la suprafaţa unei ape stagnante (după Thiery).

transportînd microorganisme patogene pentru om. De aceea, consumarea de către populaţie a apei de rîu dă uneori naştere unor îmbolnăviri masive (epidemii hidrice).

În general însă, în condiţii naturale, microorganismele patogene pentru om, de la început dezavantajate numeric prin diluare în apa care le-a transportat, nu găsesc în apele naturale condiţii de multiplicare, ci cel mult condiţii de supravieţuire temporară, datorită unor factori complecşi, ca: *a*) *diluţia mare* a substanţelor organice nutritive şi temperatura scăzută a mediului, care fac ca numărul bacteriilor patogene alohtone, mult mai exigente în această privinţă, să rămînă mic în raport cu acela al microorganismelor autohtone; *b*) *relaţiile de antagonism* dintre aceste bacterii şi organismele din microflora normală, care sînt cu mult mai numeroase şi mai bine adaptate la acest mediu; *c*) *prezenţa protozoarelor* care se hrănesc cu bacterii şi a bacteriofagilor care le pot liza; *d*) *acţiunea bactericidă a luminii solare*, în speţă a razelor ultraviolete, care este maximă la suprafaţă şi poate fi eficientă, în funcţie de limpezimea apei, pînă la adîncimea de 1 m.

Datorită acestor factori, apele de suprafaţă suferă un proces de autopurificare graţie căruia, de exemplu, la circa 10—20 km în aval de locul în care s-a produs contaminarea, apele rîurilor sînt în general lipsite de germeni patogeni.

Apele de profunzime (pînzele de apă subterană provenite din infiltrarea pînă la un strat impermeabil a apelor de precipitaţii) pot să fie sterile sau să conţină numai un mic număr de germeni, în funcţie de natura subsolului străbătut care acţionează ca un filtru mai mult sau mai puţin sterilizant. Astfel, rocile risipoase au tendinţa de a reduce numărul germenilor din apă, reţinîndu-i în cursul filtrării, în timp ce rocile calcaroase, care sînt parţial dizolvate în timpul infiltrării apei, permit trecerea microorganismelor. În afară de aceasta, cînd ies la suprafaţă pentru a forma un izvor natural, apele din profunzime antrenează în suspensie şi microorganisme din straturile superficiale ale solului.

Mările şi oceanele au o o microfloră variată şi relativ abundentă, care diferă numeric şi calitativ în raport cu distanţa de ţărm. În general, atît în linie orizontală cît şi pe verticală, microflora autohtonă a mărilor şi oceanelor este

predominantă în regiunile unde influența uscatului este slabă sau absentă. Distribuția pe verticală a microflorei marine este variabilă, numărul cel mai mare de microorganisme fiind găsit într-o zonă cuprinsă între 25 și 50 cm de la suprafață și la interfața dintre apă și mîlul sau nisipul din fund. În afară de microorganismele care în apropierea țărmului provin din sol se întîlnesc germeni, din microflora autohtonă, adaptați la condițiile speciale de mediu din mări și oceane, așa cum sînt bacteriile *criofile*, cele *halofile* și cele *barofile*.

b. Microflora aerului

În aer, microorganismele nu găsesc, în general, condiții de multiplicare, ci numai condiții de supraviețuire temporară, atît în formă vegetativă cît mai ales ca spori. În schimb, aerul are un rol important în *dispersarea* lor, vehiculîndu-le pe distanțe mari, deși unii cercetători consideră că ar exista și un adevărat plancton aerian care trăiește și se reproduce la înălțimi. Microorganismele aerobe pot exista în aer sub formă de celule dispersate sau, mai frecvent, grupate în grămezi care formează adevărate „plute" aeriene menținute timp îndelungat în stare de plutire sub influența curenților de convecție (Gregory).

Microorganismele din aer sînt reprezentate de specii provenite din sol și din ape și aparțin tuturor categoriilor sistematice: bacterii și spori bacterieni, drojdii, spori de mucegaiuri, alge și protozoare. Antrenate de particule fine de praf sau de picături foarte mici de apă, ele sînt dispersate în atmosferă unde sînt vehiculate de curenți. Numărul lor scade foarte mult la înălțimi de peste 500 m, dar ele pot ajunge pînă la 12 000 m, unde supraviețuiesc în număr mic și limitat la formele care rezistă la acțiunea frigului și a razelor ultraviolete solare.

Microflora normală a aerului este formată din organisme foarte diferite, coci și bacili cromogeni, spori de ciuperci și spori de bacili aerobi, care, purtate de curenții de aer, circulă vertical și orizontal, traversînd mările și oceanele. Numărul lor este în funcție de factorii meteorologici care le aduc, le mențin și le poartă în aer timp mai mult sau mai puțin îndelungat. Această microfloră este lipsită de germeni patogeni, care nu rezistă diluției mari, lipsei de hrană, uscăciunii, variațiilor de temperatură și, mai ales, acțiunii razelor ultraviolete.

În aerul de deasupra așezărilor omenești și, mai ales, în cel din încăperi, microflorei amintite i se adaugă microorganisme de provenință umană și animală, eliberate din diferite dejecții uscate sau eliminate prin respirația animalelor. Între acestea se găsesc uneori și microorganisme patogene care se pot răspîndi pe calea aerului de la un bolnav la un individ sănătos.

Cu ajutorul unor metode moderne de cercetare s-a constatat că în fiecare cinci minute omul sănătos elimină, în cursul respirației normale, două particule conținînd bacterii, ceea ce reprezintă un factor important de impurificare a aerului, ținînd seama de numărul de germeni care se adună astfel într-o zi în încăperi, mai ales în cele aglomerate. Eliminarea de microorganisme este mult mai mare în timpul vorbitului (circa 300 de picături încărcate cu germeni

pentru un cuvînt) şi, mai ales, în timpul strănutului, cînd secreţiile din nas, gură şi faringe, care conţin germeni, sînt proiectate cu putere, formînd aproximativ 100 000—200 000 de picături.

c. Microflora solului

Solul conţine un număr imens de virusuri (fagi) şi microorganisme (bacterii, actinomicete, ciuperci microscopice şi protozoare) de o diversitate mai mare decît în alte medii naturale.

Frecvenţa lor este maximă în straturile superioare, exceptînd suprafaţa însăşi a solului, unde numărul microorganismelor este mic din cauza acţiunii razelor ultraviolete solare şi a variaţiilor de temperatură şi umiditate. Straturile profunde pot fi lipsite de microorganisme, deoarece solul acţionează ca un filtru care, prin mecanisme complexe — mecanice, fizico-chimice şi biologice — împiedică difuziunea microorganismelor. Fac excepţie solul care prezintă crăpături şi cel străbătut de rădăcinile arborilor.

Numărul microorganismelor şi tipul lor variază şi în raport cu alţi factori ca vegetaţia, structura fizico-chimică a solului şi gradul său de îmbogăţire cu substanţă organică (resturi de plante şi animale moarte, dejecţii animale etc.). În linii denerale, microflora este mai abundentă în solurile cultivate — bogate în substanţe nutritive — se care poate ajunge pînă la cîteva milioane pe gram — şi este relativ rară în solurile acide, alcaline şi în cele sărace în substanţă organică şi nisipoase.

În sol, în afară de microflora lui normală, se mai pot găsi unele microorganisme patogene pentru plante sau pentru om şi animale. Agenţii patogeni ai animalelor cu sînge cald nu găsesc în sol condiţii de multiplicare, ci cel mult condiţii de supravieţuire temporară. Ca urmare, după un timp variabil ei dispar, sub influenţa procesului natural complex şi permanent de autopurificare a solului. Fac excepţie sporii unor bacterii de patogene pentru om şi alte mamifere care sînt foarte rezistenţi şi pot supravieţui timp îndelungat în sol (de exemplu, *Bacillus anthracis, Clostridium botulinum, Cl. tetani*) şi unele ciuperci patogene. La unele specii ca, de exemplu, *Cl. botulinum*, prezent în 5—91% din soluri, dependenţa de gazda lor animală este atît de slabă, încît ele sînt capabile să supravieţuiască şi uneori chiar să se multiplice în sol, astfel că este greu de spus dacă habitatul lor natural este reprezentat de intestinul diferitelor animale sau de solul însuşi.

2. CĂILE DE RĂSPÎNDIRE A MICROORGANISMELOR ÎN NATURĂ

Bacteriile care au organe de locomoţie, cili sau flageli, pot înota, pe o distanţă oarecare de la locul de origine, atunci cînd condiţiile mediului sînt favorabile. La formele acvatice, răspîndirea este facilitată de curenţii de convecţie şi de alţi curenţi din apă. Existenţa fenomenelor de foto- şi chimiotaxie sugerează că mobilitatea celulelor microbiene ar avea o valoare adaptativă, permiţînd microorganismelor să răspundă rapid la variaţiile condiţiilor

ambiante, prin deplasarea lor fie în direcţia locului unde acţionează un anumit factor de mediu (tactism pozitiv), fie în direcţia opusă (taotism negativ). În afară de aceasta, mucegaiurile şi, în măsură mai mică, levurile şi bacteriile, se pot extinde în mediu pur şi simplu prin creştere directă. Astfel, miceliile unor mucegaiuri pot creşte cu o viteză de aproximativ 25 cm pe zi sau chiar mai mult.

Modalitatea de răspîndire cea mai frecventă este însă cea aeriană, la care cele mai bine adaptate sînt mucegaiurile. Acestea emit conidiofori la suprafaţa mediului umed pe care cresc şi ale căror conidii se desprind uşor şi sînt răspîndite chiar de cei mai slabi curenţi din aer. În unele cazuri, numărul sporilor proveniţi de la un singur corp de fructificare este enorm (10^9—10^{12} după Wolf, 1947), iar existenţa unor mecanisme particulare asigură în unele cazuri proiectarea lor la distanţe cuprinse între circa 2 şi 6 m. Spre deosebire de mucegaiuri, bacteriile şi levurile nu pot fi răspîndite prin curenţii de aer decît după ce materialul în care se găsesc este uscat şi pulverizat. Ca urmare, aerul atmosferic conţine mai mulţi germeni cînd vremea este uscată şi vîntoasă, decît atunci cînd este umedă şi calmă.

Animalele poartă cantităţi considerabile de microorganisme în intestin şi la suprafaţa tegumentului, reprezentînd astfel un factor activ de răspîndire a acestora cu ocazia deplasării lor în natură. Omul, la care celulele bacteriene reprezintă circa 25% din greutatea fecalelor, elimină zilnic 10^{11} celule bacteriene şi un număr ceva mai mic de fungi coprofili şi protozoare. În mod similar se comportă toate animalele domestice şi sălbatice. Rîmele şi alte nematode asigură răspîndirea pe verticală şi orizontală a microorganismelor în sol, ingerîndu-le o dată cu resturile de plante şi depunîndu-le prin fecale la distanţă de locul lor de origine. În ape, animalele înotătoare şi plantele care plutesc transportă la distanţe mari microorganismele care aderă la ele.

Distribuţia verticală a microorganismelor este mult influenţată de procesele de sedimentare din aer şi mai ales din ape, procese care exercită o funcţie naturală de epurare a acestor medii. Prezenţa substanţelor solide, ca şi a parti-

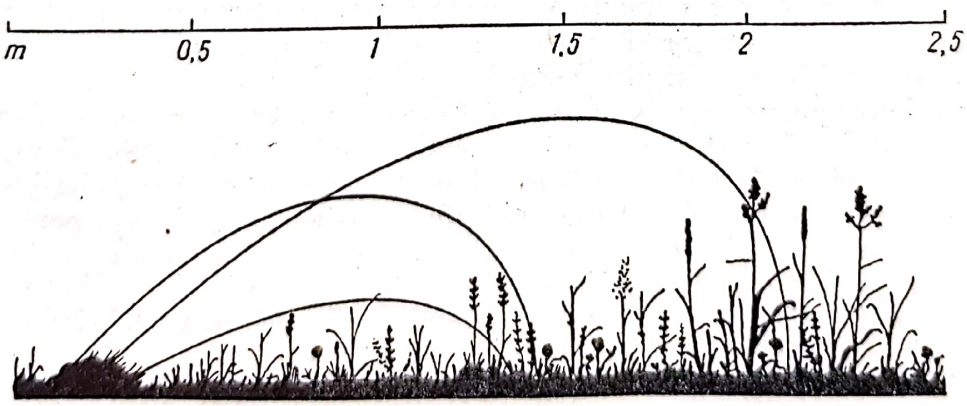


Fig. 357. Diseminarea sporilor în natură. În desen sînt trasate traiectoriile a trei spori de *Pilobolus longipes*, proiectaţi la distanţă prin ruperea sporangelui (după Buller).

culelor de orice fel pentru care bacteriile au în mod obişnuit o afinitate destul de mare, ajută sedimentarea şi intensifică acest proces natural care asigură concentrarea microorganismelor în straturile inferioare ale mediilor acvatice şi ale aerului atmosferic.

3. RELAŢII ECOLOGICE ÎNTRE MICROORGANISME ŞI ALTE ORGANISME

Ca şi celelalte organisme vii, microorganismele — care sînt răspîndite pretutindeni în natură unde sînt condiţii permiţînd existenţa unei forme de viaţă — se găsesc de cele mai multe ori în *asociaţii* mai mult sau mai puţin strînse cu alte organisme.

În acest cadru natural bacteriile, de exemplu, vin în legătură directă cu alte bacterii, cu virusuri, cu fungi, alge, plante superioare şi animale.

În general, asociaţiile de microorganisme din natură nu au un caracter constant, ci sînt mai curînd temporare şi accidentale, fiecare dintre speciile respective putînd să trăiască şi separat. Cu toate acestea, în relaţiile care se constituie astfel, foarte puţine specii se comportă strict neutru. De cele mai multe ori, raporturile de asociere au diferite semnificaţii biologice, microorganismele reacţionînd unele faţă de altele în mod favorabil şi sinergic sau, dimpotrivă, antagonic.

Studiul relaţiilor ecologice ale microorganismelor în diferite medii întîmpină dificultăţi foarte mari în raport cu acela al relaţiilor dintre microoragnisme, datorită numărului enorm de specii microbiene, dimensiunilor extrem de mici şi multiplicării rapide a celulelor, necesităţii de utilizare a unor tehnici speciale de cercetare şi mai ales variabilităţii foarte largi a diferitelor sisteme naturale. Manifestările interacţiunilor dintre partenerii unei asociaţii microbiene sînt condiţionate de factorii de mediu care acţionează în momentul observaţiei. De aceea, termenii utilizaţi în mod obişnuit pentru a defini tipul de relaţie biologică, *simbioză, comensalism, mutualism, parazitism* etc., nu implică o stare de permanenţă a relaţiei, întrucît în realitate aceasta are un caracter dinamic. Unele microorganisme originar parazite pot intra în relaţii de mutualism cu gazda lor şi tot aşa unii comensali sau simbionţi pot deveni în anumite condiţii paraziţi distrugători.

Interacţiunile microorganismelor sînt foarte complexe. În forma ei cea mai simplă, relaţia reciprocă dintre două populaţii microbiene poate fi exprimată prin relaţia reciprocă $A \rightleftarrows B$, în care A şi B sînt cele două populaţii asociate, iar săgeţile pot corespunde fiecare unui efect pozitiv, negativ sau neutru (nul) asupra partenerului. Prin urmare, chiar pentru un asemenea cuplu foarte simplu sînt posibile 9 (32) stări sau tipuri de relaţie diferite calitativ.

În general, terminologia folosită pentru caracterizarea diferitelor interacţiuni dintre organisme are de obicei rostul să precizeze dacă o populaţie beneficiază, este păgubită sau nu este influenţată de asociaţii săi. Adeseori ea este însă destul de vagă şi confuză şi, ca urmare, nu este unanim acceptată.

Astfel, termenul *simbioză* este folosit de mulţi cercetători (Stanier, Brock etc.) în sensul etimologic al cuvîntului („viaţă împreună"), pentru a

caracteriza existența a două forme diferite de viață aflate în asociație strînsă și continuă, rezultatul asocierii lor putînd fi reprezentat de diferite tipuri de influență reciprocă (inclusiv cele defavorabile). În sens mai restrîns, acest termen — imaginat de De Bary (1879) pentru a caracteriza asociația benefică dintre alge și fungi în cazul lichenilor — este folosit în mod convențional cu semnificația de *mutualism*, pentru a caracteriza o relație implicînd dezvoltarea simultană a unor specii diferite care exercită o influență bilaterală favorabilă.

În asociațiile simbiotice dintre microorganisme și animale sau plante, ca și în alte simbioze, detaliile calitative ale interrelației depind nu numai de proprietățile intrinsece ale simbionților, ci și de caracteristicile mediului în care se stabilește asociația.

Dependența relațiilor simbiotice de factorii uneori labili ai mediului ambiant explică de ce sînt posibile controverse asupra naturii reale a fenomenului de simbioză: manifestările aparente ale acestui tip de relație maschează, în anumite împrejurări, o veritabilă luptă între cei doi parteneri. Astfel, ciupercile de micoriză sînt de fapt parazite pentru gazdele lor, provocîndu-le o infecție generatoare a unei stări de boală, dar această stare de boală a devenit esențială pentru dezvoltarea plantei superioare deși, nu mai puțin, îi poate opri creșterea sau chiar determina moartea (Caullery). Pe de altă parte, fungii de micoriză pot într-adevăr să invadeze țesuturile gazdei, distrugîndu-le, dar în același timp o mare parte din miceliul lor este distrus de anumite celule cu proprietăți fagocitare ale plantei.

În mod similar, în asociațiile pe care le reprezintă lichenii există un conflict între alge și fungi, unul dintre asociați comportîndu-se ca parazit, astfel că nici în acest caz ideea că este vorba de asociații pur mutuale cu beneficii reciproce nu este justificată (Dubos, 1963, Caullery).

În asociația dintre bacteriile de nodozități și plantele leguminoase, inițierea simbiozei seamănă ca și în cazul micorizelor, cu debutul unui proces infecțios, deoarece ea se traduce prin alterarea superficială a perilor radiculari urmată de pătrunderea, progresiunea și proliferarea bacteriilor, la care planta răspunde printr-o creștere anormală a țesutului invadat. De obicei benefică, o asemenea asociație nu are însă în mod obligatoriu acest caracter. Într-adevăr, există fixatori de azot „ineficienți", deveniți incapabili să fixeze N_2, în care caz planta nu are nici un avantaj de pe urma activității vitale a bacteriilor găzduite, dar care se hrănesc totuși pe seama plantei care le găzduiește: simbioza presupusă a avea un caracter de mutualism este de astă dată un parazitism localizat.

a. Relații ecologice între microorganisme și macroorganisme

Principalele tipuri de relații între microorganisme și organismele superioare sînt *comensalismul, simbioza, „oportunismul"* și *parazitismul*.

Comensalismul reprezintă cea mai simplă formă de asociație în care microorganismele trăiesc și se hrănesc în strînsă relație cu gazda, dar nu pe seama

ţesuturilor ei, ceea ce nu antrenează urmări vizibile pentru macroorganism. Este întîlnit, de exemplu, în cazul bacteriilor saprofite ale pielii, care se hrănesc cu substanţele din detritusul organic de pe suprafaţa tegumentelor.

Simbioza este un tip de asociaţie presupus a avea unele caractere beneficiale, atît pentru microorganism, cît şi pentru gazdă. Se întîlneşte, de exemplu, la plantele leguminoase asociate cu bacteriile fixatoare de N_2 din nodozităţile lor *(Rhizobium)*, iar la om şi la animale în cazul asociaţiei cu unele specii din microflora normală a intestinului. Aceste microorganisme enterice sintetizează în cursul metabolismului lor diferite vitamine utilizate apoi de organismul-gazdă, iar la rîndul lor îşi găsesc în intestinul acestuia condiţiile de nutriţie şi de mediu necesare dezvoltării.

Microorganismele simbionte reprezintă însă, de fapt, paraziţi care, împreună cu specia lor gazdă, au evoluat pînă la un stadiu de toleranţă mutuală completă, astfel încît ele sînt în mod normal prezente în fiecare individ-gazdă al speciei. Simbioza este deci un tip de infecţie atenuată, aproape totdeauna potenţial dăunătoare unuia dintre parteneri. Ca urmare, există riscul ca, în anumite condiţii, şi cel mai perfect adaptat simbiont să poată deveni patogen (de exemplu, colibacilul şi alte microorganisme din intestin).

„*Oportunismul*" (de la engl. *opportunity*=prilej favorabil) este un tip de relaţie cu gazda, caracteristic acelor bacterii care, incapabile în condiţii normale să producă boala organismului-gazdă, pot determina infecţii grave sau chiar mortale atunci cînd rezistenţa acestuia este diminuată din diferite motive, sau cînd propria lor biologie este modificată sub acţiunea unor factori accidentali.

Microflora saprofită a pielii şi a mucoaselor (bucală, nazală, intestinală etc.), adaptată la condiţiile de mediu oferite în mod normal de ţesuturile intacte şi lipsită de proprietăţi invadante şi toxice, poate deveni patogenă dacă distrugerea acestor ţesuturi îi permit trecerea dincolo de straturile lor superficiale. Între cauzele care pot activa însuşirile patogene potenţiale ale unor astfel de microorganisme, se citează, în afară de leziunile locale, slăbirea rezistenţei generale a gazdei prin infecţii intercurente, surmenajul, dezechilibrul alimentar, şocurile, traumatismele etc., precum şi creşterea virulenţei germenilor printr-un fenomen de variabilitate.

Un alt exemplu caracteristic este oferit de partenerii asociaţiei fuzospirilare — *Borrelia vincenti* şi *Fusobacterium fusiforme* — care, separaţi sau asociaţi, trăiesc comensal în cavitatea bucală a omului. Cînd rezistenţa gazdei este slăbită, ei provoacă o infecţie severă (angina, stomatita sau faringita ulcero-membranoasă); de asemenea, aspiraţi retrograd în pulmonii propriei lor gazde, devin patogeni şi produc îmbolnăviri grave (abcese, gangrene etc.).

Exemple de „oportunism" sînt frecvente şi în cazurile de dezechilibru dintre diferitele grupuri de microorganisme intestinale *(disbacterioze)*, întîlnite în cursul tratamentului cu antibiotice. Microflora normală a intestinului uman şi animal este formată dintr-un număr imens de microorganisme aparţinînd la diverse specii şi grupuri fiziologice. În mod normal, aceste specii se găsesc într-un echilibru numeric determinat de interrelaţiile dintre ele, unele cu caracter antagonist, care asigură dezvoltarea lor armonioasă, împiedicînd prevalenţa excesivă a unora în dauna altora. În cazul administrării pe cale bucală

a unor antibiotice cu spectru larg (teramicină, aureomicină, cloramfenicol), microorganismele sensibile sînt distruse, iar cele rezistente (de exemplu, genul *Candida*), rămase fără antagoniştii lor naturali, se multiplică excesiv, producînd infecţii grave. Pentru acest motiv, utilizarea antibioticelor menţionate trebuie asociată cu un aport bacterian sporit prin ingestia de iaurt, bogat în germeni din grupul *Lactobacillus*, şi cu administrarea de vitamine din grupul B, care reprezintă factori de creştere esenţiali pentru microflora normală.

Parazitismul este tipul de relaţie în care microorganismele trăiesc şi se multiplică pe seama organismului-gazdă. Prin urmare, în condiţii naturale, microorganismele parazite utilizează pentru nutriţie un substrat viu, în opoziţie cu microorganismele saprofite care au nevoie de substraturi neanimate (substanţe organice şi anorganice), provenite de la organismele vii sau moarte.

Adaptîndu-se la parazitism, bacteriile pierd numeroase din caracteristicile lor iniţiale, dobîndind în acelaşi timp unele noi, proprii acestui tip de nutriţie, ca de exemplu exigenţe crescute în ce priveşte unele condiţii de hrană şi de temperatură, atît în mediul lor natural, în organismul-gazdă, cît şi în cazul cultivării lor pe medii artificiale.

Microorganismele parazite au o importanţă foarte mare, deoarece produc boli infecţioase transmisibile *(contagioase)* la om, animale şi plante.

Microflora normală a omului şi animalelor. Organismele umane şi animale sînt în permanent contact cu diferite microorganisme, fie direct, fie prin intermediul unor substanţe contaminate. Ca urmare, la suprafaţa tegumentelor şi în anumite cavităţi ale corpului lor, animalele şi omul găzduiesc unele virusuri şi o populaţie microbiană eterogenă, alcătuită din bacterii, fungi şi protozoare, organisme nepatogene sau slab ori numai condiţionat patogene, care formează aşa-numita *microfloră normală* sau *indigenă*. Această microfloră s-a constituit prin selecţionarea dintre numeroasele grupe de microorganisme din natură a unui număr relativ limitat de specii adaptate la o convieţuire cu organismul animal. Selecţia este reglată de factori care derivă în parte din activitatea vitală a gazdei şi în parte din caracteristicile fiziologice ale microorganismelor. Deşi microflora normală este diferită — ca număr de indivizi şi compoziţie în specii — de la o regiune a corpului la alta, ea trebuie totuşi privită ca o *unitate* ai cărei componenţi alcătuiesc împreună grupul denumit de Rosebury *microbiota*.

Microflora normală nu este însă o entitate absolută, constantă, ci reprezintă o populaţie microbiană, care la animalul sănătos poate fi considerată ca aflîndu-se într-un echilibru dinamic cu gazda. Acest echilibru dinamic se traduce, după unii cercetători (M. Lev), printr-o *stare simbiotică normală*, iar modificarea lui unidirecţională poate avea efecte beneficiale sau, cel mai adesea, dăunătoare pentru gazdă.

Majoritatea organelor interne şi a mucoaselor sînt sterile în momentul naşterii. Datorită faptului că hrana nu este sterilă şi, ca urmare a contactului cu fiinţele din jur, în organismul uman şi animal se stabilesc, la cîteva ore după naştere, diferite *microbiocenoze* mai mult sau mai puţin caracteristice şi eterogene. Cea mai importantă, atît numeric, cît şi ca semnificaţie biologică este

aceea din tubul digestiv, în special din intestinul terminal, iar cea mai restrînsă este cea din cavităţile nazale (sute de microorganisme/ml lichid de lavaj).

Biocenoza intestinală include un număr foarte mare de celule microbiene, reprezentînd, în stare uscată, aproximativ 25% din greutatea uscată a materiilor fecale şi circa 8 g celule microbiene.

Numărul bacteriilor vii din fecalele umane este de 10^{11} per gram fecale, ceea ce echivalează cu aproximativ 0,15 kg masă microbiană vie, reprezentînd cam 10% din greutatea conţinutului total al colonului. Această microfloră desfăşoară o activitate fiziologică intensă. Presupunînd că fiecare bacterie consumă într-un minut o cantitate de hrană egală cu greutatea sa (unele pot face acest lucru în 20 de secunde) rezultă dintr-un calcul simplu efectuat pentru o durată de 24 de ore (0,15 kg×1 440 de minute=216 kg) că bacteriile din colonul uman pot prelucra 200 kg hrană/zi, ceea ce înseamnă de 200 de ori conţinutul total al colonului. Deoarece omul consumă în medie 1,5 kg hrană pe zi, este evident că bacteriile intestinului prelucrează de mai mult de 100 de ori această hrană ingerată de om, în timp ce omul o prelucrează o singură dată.

Predominanţi şi nelipsiţi în microflora intestinală sînt reprezentanţi ai genurilor *Bacteroides* (zeci şi sute de miliarde/g), *Fusobacterium* şi *Veillonella*, *Lactobacillus*, anaerobi ca *Bifidobacterium* şi aerobi ca *L. acidophillus*, precum şi coliformi, streptococi fecali, unii membri ai grupului *Proteus* etc. Datorită interrelaţiilor ei multiple, această microfloră intestinală se află într-o stare de *cubioză*, de dezvoltare armonioasă, în care se creează proporţii numerice relativ echilibrate între specii şi un grad de stabilitate accentuată a acestor proporţii, ceea ce asigură o toleranţă completă din partea organismului-gazdă. Alterarea echilibrului normal în sînul biocenozei, sub acţiunea unor condiţii patologice sau a administrării pe cale orală a unor antibiotice cu spectru larg, determină o stare de *disbioză* care poate avea repercusiuni grave asupra organismului uman sau animal, ca urmare a multiplicării excesive a unui anumit grup de microorganisme avantajat de condiţiile generale sau locale modificate.

Tegumentele omului şi animalelor poartă numeroase microorganisme care se hrănesc pe seama substanţelor organice provenite din descuamări şi secreţiile glandelor cutanate.

Căile respiratorii inferioare ale omului (bronhii şi alveole) sînt, în general, lipsite de germeni, datorită faptului că majoritatea microorganismelor sînt reţinute la nivelul filtrului reprezentat pentru tot arborele respirator de mucoase şi secreţii nasofaringiene. Numărul cel mai ridicat de germeni şi cea mai mare diversitate de specii (*Haemophillus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, difteroizi, micrococi etc.) se întîlnesc în nasofaringe care, steril la naştere, este contaminat în 2—3 zile cu microflora comensală şi microorganismele patogene purtate de persoanele din jurul copilului. Din cînd în cînd, comensalii din microflora normală a gurii, a nasofaringelui şi a tubului digestiv pot să treacă în sînge şi în ţesuturi, de unde sînt eliminaţi rapid, graţie unor reacţii normale de apărare nespecifică realizată, în special prin *fagocitoză*. De aceea, ţesuturile normale ale organismelor animale sînt sterile, ca şi unele exoreţii cum este urina.

Rolul microorganismelor în viaţa organismelor animale. Pusă iniţial de Pasteur (1885) această problemă a primit un răspuns abia în ultimii ani,

cînd condiţiile tehnice au permis lui Reyniers (1949) obţinerea de animale în stare de *gnotobioză* [1], adică private de microflora lor normală.

Animalele gnotobiotice pot fi împărţite în două categorii principale: 1) animale *sterile bacteriologic* sau *axenice* („germ-free") pe care sau în interiorul cărora nu se găseşte nici un microorganism viu detectabil şi 2) *animale gnotoforice* [2], care iniţial sterile bacteriologic, sînt contaminate deliberat cu anumite microorganisme cunoscute.

Un animal *germ-free*, contaminat cu o singură specie de microorganisme, este monognotoforic; animalul şi microorganismul alcătuiesc în acest caz un *sistem dibiotic*, fiecare partener fiind un dibiont. Dacă animalul este contaminat cu două specii de microorganisme, el este dignotoforic şi, împreună cu cele două specii microbiene contaminante, formează un *sistem tribiotic* în care cei trei parteneri sînt tribionţi ş.a.m.d.

Caracteristica biologică majoră care diferenţiază animalele axenice de cele convenţionale (normale) este lipsa microflorei de miliarde de germeni din tubul digestiv al celor dintîi.

Cu ajutorul unor tehnici speciale, numeroase animale (cobai, găini, iepuri, porci, cîini, oi, gîndaci, melci etc.) au putut fi menţinute în condiţii de absolută sterilitate bacteriologică, uneori timp de mai multe generaţii, comportarea lor rămînînd aparent normală. Dezvoltarea animalelor *germ-free* este totuşi anormală sub mai multe aspecte: *1*) organele în mod firesc colonizate de bacterii sînt în general reduse ca mărime şi capacitate; *2*) intestinul, deşi funcţional, este foarte subţire, mai puţin musculos, lipsit de tonus, mai palid; *3*) cecul, în schimb, este foarte dezvoltat (la şoarecele axenic el reprezintă pînă la 30% din greutatea corporală, faţă de 1—3% la şoarecele normal); *4*) dejectele nu au miros fecal şi amoniacal; *5*) carnea este lipsită de gust şi de miros; *6*) sistemul limfatic este slab dezvoltat; *7*) fagocitele sînt pasive, dar dacă animalele axenice sînt transferate într-un mediu contaminat, reacţiile lor de apărare faţă de infecţii sînt activate rapid.

Utilizarea experimentală a animalelor axenice a arătat că microflora normală, în special cea intestinală, poate exercita mai multe efecte beneficiale asupra organismului-gazdă: *1*) microorganismele intestinale sintetizează vitamine, ca vitamina K, acidul folic, acidul nicotinic, tiamina, riboflavina, piridoxina, acidul pantotenic şi biotina, necesare în metabolismul organismului animal; *2*) activităţile metabolice ale microflorei normale favorizează sănătatea gazdei, împiedicînd implantarea în intestin a unor organisme străine, toxigene sau patogene; *3*) microflora intestinală stimulează mecanismele de apărare ale gazdei, determinînd o creştere relativ nespecifică a rezistenţei acesteia la boală; *4*) la unele animale, microflora participă direct în procesele de digestie, aşa cum este cazul rumegătoarelor şi al altor categorii de organisme; *5*) aşa cum o arată modificările anatomice şi histologice observate la

---

[1] *Gnotobioza* (în gr. „viaţă cunoscută"), termen definind situaţia particulară a animalelor care trăiesc în stare de sterilitate bacteriologică sau sînt contaminate în mod intenţionat numai cu anumite specii de microorganisme.

[2] De la gr. *gnosis*=cunoaştere şi *forein*=a purta.

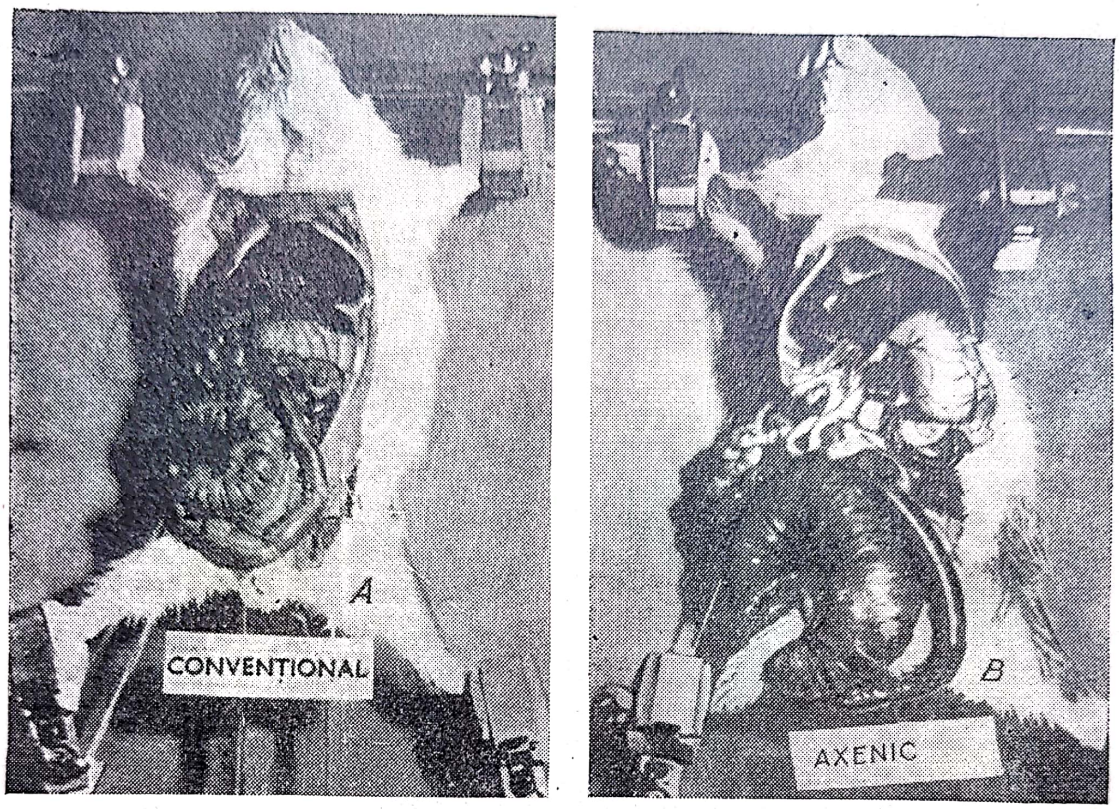


Fig. 358. Aspectul viscerelor — în special al coecumului la un cobai crescut în condiții de viață normală (animal „convențional") *(A)* în comparație cu unul crescut în condiții de sterilitate bacteriologică (axenic-*germ-free*) *(B)*.

animalele axenice, microflora autohtonă este necesară pentru dezvoltarea normală a diferitelor organe, care ar fi corelată cu prezența unor stimuli fiziologici legați de activitatea unor anumite microorganisme. Contaminarea per orală cu bacterii determină rapid la animalele pînă atunci axenice o modificare în arhitectura și histologia intestinului, care astfel ajunge în cîteva săptămîni să aibă aspectul caracteristic al intestinului animalelor convenționale.

Pentru majoritatea speciilor animale, microflora indigenă *(microbiota)*, deși interferă activ și pregnant cu diferite procese fiziologice, nu este esențială pentru existența gazdei și, ca atare, nu este indispensabilă vieții acesteia. La ierbivorele rumegătoare, trăind în condiții naturale de hrană, microflora intestinală este însă absolut necesară pentru digestie și deci pentru însăși existența organismului, datorită lipsei celulazelor din sucurile digestive ale acestor animale a căror hrană, exclusiv vegetală, este în bună parte celulozică.

Microorganismele simbiotice ale rumegătoarelor. Mamiferele nu posedă enzimele necesare scindării celulozei. De aceea, la ierbivorele rumegătoare transformările biochimice ale hranei lor vegetale, foarte bogată în celuloză, se realizează în cursul procesului de digestie cu preponderență prin activitatea metabolică a unei microflore celulozolitice rezidente în rumen. La ierbivorele nerumegătoare (calul), ca și la omnivore ca porcul sau la rozătoare ca iepurele,

digestia celulozei efectuată într-un cecum mărit este relativ ineficientă în comparaţie cu acelaşi proces evoluînd cu eficienţă maximă în rumenul ierbivorelor rumegătoare.

Rumenul se comportă ca o enormă cameră de incubaţie anaerobă (cu capacitate de circa 100 l la bovidee), în care se găseşte o populaţie microbiană eterogenă (reprezentată în special de bacterii şi protozoare), cu o densitate comparabilă aceleia a celor mai bogate culturi (10^{10}—10^{11} organisme/ml) şi cu o diversitate de proprietăţi enzimatice permiţînd metabolizarea tuturor acestor microorganisme, celuloza şi alte glucide din furaje sînt fermentate cu degajare de energie şi cu formarea de acizi graşi simpli stabili (acetic, propionic, butiric) şi a unor cantităţi mari de gaze (bioxid de carbon şi metan, 60—80 l/zi). Energia eliberată prin aceste procese de degradare este folosită de microorganisme pentru propria lor creştere şi pentru sinteza unor substanţe complexe ca, de exemplu, vitamine din grupul B. Acizii graşi sînt absorbiţi prin peretele rumenului şi sînt folosiţi ca sursă de energie prin oxidare în diferite ţesuturi. Masa celulară microbiană, reprezentînd constitutentul de importanţă fiziologică majoră al bolului alimentar, este digerată în compartimentele posterioare ale stomacului sub acţiunea proteazelor, fiind astfel folosită de animal ca sursă esenţială sau chiar unică de proteine.

Fermentaţia celulozei este realizată în special de coci şi bacili Gram-negativi, ca *Ruminococcus flavafaciens, R. albus, Bacteroides succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens* etc., iar producerea masivă de metan se datoreşte lui *Methanobacterium ruminantium;* rolul protozoarelor nu este încă definit. Aceste microorganisme găsesc în rumen condiţii avantajoase de trai, constînd din: *a*) temperatură favorabilă constantă (39°C); *b*) anaerobioză şi concentraţie mare de CO_2; *c*) substanţe minerale în cantităţi optime; *d*) abundenţă de glucide fermentescibile şi *e*) surse simple de N, în speţă uree şi săruri de amoniu utilizate preferenţial faţă de aminoacizii preformaţi, ceea ce este avantajos pentru organismul animalului.

La rîndul său de pe urma activităţii vitale a acestor microorganisme, animalul beneficiază şi el de avantaje deosebite şi, ca atare, suferă adaptări structurale şi funcţionale corespunzătoare. Stomacul său este un organ complex şi compartimentat, cu porţiuni lărgite cum sînt rumenul şi reticulumul, adevărate camere mari de fermentaţie, în care hrana poate fi reţinută timp îndelungat, ceea ce asigură tranzitul ei lent, favorabil desfăşurării proceselor de degradare microbiană. Saliva este abundentă, dar lipsită de enzime, constînd numai dintr-o soluţie salivară diluată de bicarbonat şi fosfat de sodiu, compuşi necesari activităţii bacteriene. Acizii graşi inferiori rezultaţi din degradarea celulozei înlocuiesc glucidele ca sursă de energie şi, ca urmare, ţesuturile animalelor sînt mai bine echipate enzimatic pentru oxidarea lor. Nevoile de azot ale rumegătoarelor sînt satisfăcute pe altă cale decît acelea ale celorlalte mamifere: compuşi simpli ca ureea şi amoniacul sînt convertiţi de microroganisme în proteine microbiene, digerabile prin intermediul unor proteaze din încăperile posterioare ale stomacului. Rumegătoarele îşi obţin deci aminoacizii necesari pornind nu de la proteinele vegetale ingerate, ci de la proteina celulelor

microbiene care s-au multiplicat în rumen. Pe lîngă aminoacizi, microorganismele furnizează animalului şi cantităţi importante de vitamine, în special din grupul B, conferindu-i astfel independenţă faţă de sursele exogene de vitamine.

b. Relaţii ecologice între microorganisme

Neutralismul, care corespunde unor relaţii de indiferenţă între două sau mai multe specii, este un fenomen destul de rar. El este întîlnit în special atunci cînd populaţiile microbiene sînt destul de îndepărtate una de alta sau, mai ales, cînd se deosebesc mult între ele prin exigenţele lor nutritive şi, ca urmare, nu pot intra în competiţie pentru un acelaşi substrat.

Mutualismul constă în dezvoltarea simultană pe un substrat comun a unor specii diferite, care exercită una asupra alteia o influenţă bilaterală favorabilă. El reprezintă un tip de interrelaţie nutriţională între două specii de microorganisme care au nevoie una de alta pentru dobîndirea anumitor metaboliţi esenţiali. Relaţia poate fi pusă în evidenţă pe medii de cultură deficiente, în care nici unul dintre microorganisme nu poate creşte separat. Rivers a arătat că bacteriile din speciile *Haemophilus canis* şi *H. parainfluenzae* nu cresc atunci cînd sînt însămînţate separat în apă peptonată, în timp ce dacă sînt asociate dau în acest mediu culturi abundente. Analiza activităţii lor metabolice a arătat că fiecare dintre ele face sinteza unui factor de creştere absolut necesar celeilalte, care însă nu are ea însăşi capacitatea de a-l elabora. Astfel, *H. canis* sintetizează factorul *V* (coenzimele I şi II, respectiv NAD şi NADP), iar *H. parainfluenzae*, factorul *X* (hematina). Consumul în factor de creştere endogen al fiecăreia dintre ele este inferior producţiei lui prin biosinteză, astfel că excesul din fiecare factor de creştere difuzează în mediu, de unde este utilizat de bacteria asociată, incapabilă de a-l sintetiza.

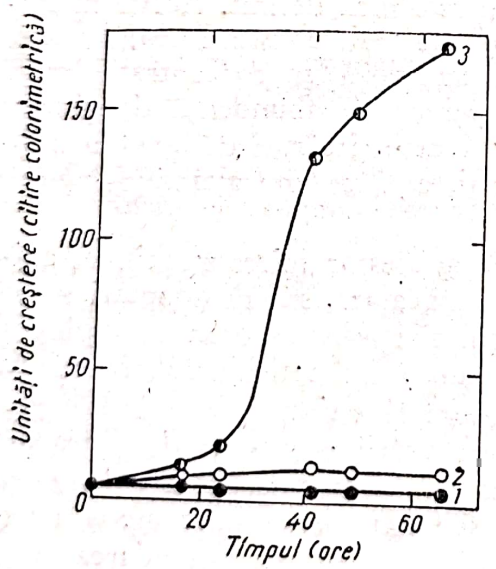


Fig. 359. Cinetica multiplicării bacteriilor *Lactobacillus arabinosus* cu *Streptococcus faecalis*, separat şi în simbioză, pe medii de cultură sintetice lipsite de fenilalanină şi acid folic:

1 — *S. faecalis* (tulpină cu nevoie de acid folic); *2* — *L. arabinosus* (tulpină cu nevoie de fenilalanină); *3* — curba de creştere a celor două tulpini în asociaţie.

Un alt exemplu este acela al asocierii unor microorganisme care nu fac sinteza fracţiunii pirimidinice din molecula tiaminei (vitamina B_1) cu o specie care nu poate sintetiza componenta tiazolică din constituţia aceleiaşi molecule. Însămînţate separat, cele două tipuri de microorganisme nu cresc pe medii fără vitamină B_1. Asociate însă, ele se dezvoltă bine pe asemenea medii, deoarece fiecare specie acoperă prin sinteză atît nevoile proprii cît şi pe cele ale speciei asociate.

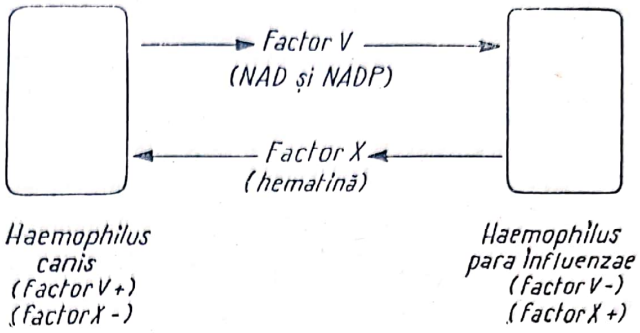


Fig. 360. Mecanismul biochimic al relației de mutualism între *Haemophilus canis* și *H. parainfluenzae* (+ =capacitate de sinteză; — =incapacitate de sinteză). Fiecare bacterie sintetizează în exces cîte o substanță care este factor de creștere pentru cealaltă.

Comensalismul microbian sau metabioza este caracterizat prin creșterea împreună a două specii de microorganisme aflate într-o relație în care una profită de asociere, iar cealaltă, în aparență, nici nu profită nici nu este influențată negativ. El are ca rezultat dezvoltarea unui anumit microorganism grație prezenței concomitente în același mediu a unui microorganism aparținînd altei specii și se realizează prin diferite mecanisme:

1) *Un microorganism produce un metabolit necesar celuilalt.* Majoritatea transformărilor suferite de compușii S, C și N în circuitul lor biologic în natură împiedică producerea de către anumite organisme a unor substanțe care sînt folosite de altele. Exemplele în acest sens sînt numeroase. Bacteriile care oxidează nitriții la nitrați (*Nitrobacter, Nitrocystis* etc.) nu se pot dezvolta în sol decît grație prezenței simultane a bacteriilor care oxidează amoniacul în nitriți (*Nitrosomonas, Nitrosocystis*) și care le furnizează astfel substanța azotată absolut necesară nutriției. În acest cadru se includ și unele relații de *sintrofie* (hrănire împreună) ca, de exemplu, acelea în care sînt implicate microorganisme deficitare sub raportul unor capacități de sinteză și microorganisme capabile să-și sintetizeze materialul celular pornind de la compuși organici din mediu și să excrete diferiți aminoacizi sau vitamine esențiale pentru creșterea celor dintîi. În felul acesta, unele organisme mai exigente sub raportul nevoii de factori de creștere sînt alimentate de microorganismele „excretoare" și de aceea formează pe mediile solide numai colonii „satelite", situate în vecinătatea directă a coloniilor acestora din urmă.

Desulfovibrio produce pe cale anaerobă hidrogen sulfurat, care este oxidat de

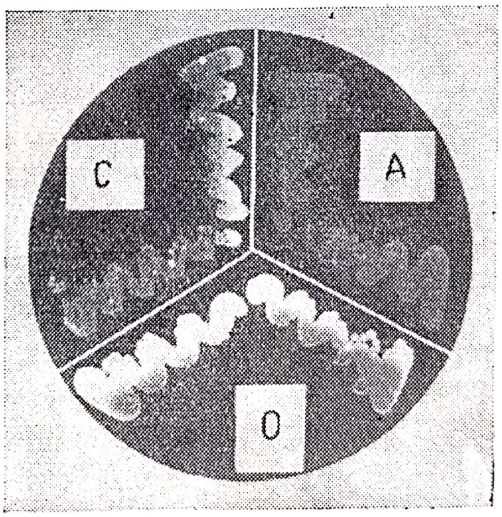


Fig. 361. Fenomenul de sintrofie evidențiat prin cultivarea pe aceeași placă a trei mutante de *E. coli* incapabile să facă sinteza argininei și denumite cu inițiala produsului pe care nu-l pot sintetiza ca rezultat al pierderii prin mutație a capacității de a produce enzima care catalizează treapta metabolică respectivă:

O — ornitina; *C* — citrulina; *A* — arginina. Deoarece tulpina *A* este incapabilă să realizeze ultima treaptă a căii metabolice, în mediu se acumulează citrulina, cu care se hrănesc mutantele *C* și *O*; la rîndul ei, tulpina *C* sintetizează ornitina care servește ca hrană tulpinei *O* (după Davis).

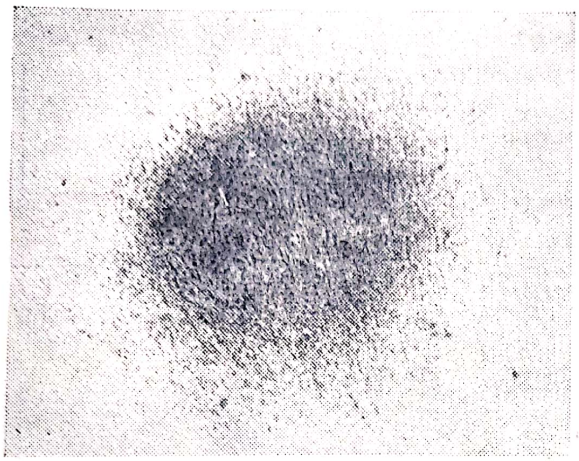


Fig. 362. Microcolonii de *E. coli* auxotrofe dependente de valină şi izoleucină, dezvoltate în jurul unei colonii prototrofe a aceleeaşi bacterii. Celulele mutante s-au dezvoltat sub formă de microcolonii în jurul coloniilor prototrofe care produc şi liberează în mediu aceşti factori de creştere (după Stanier).

bacteriile sulfuroase nepigmentate sau este utilizat ca donator de electroni de către bacteriile sulfuroase fotosintetizante roşii şi verzi. Numeroase alge secretă polizaharide, acizi organici şi polipeptide, care sînt folosite ca hrană de bacterii. În fermentaţia produsă de drojdii asupra sucului de fructe se acumulează alcool etilic servind drept metabolit de bază bacteriilor din genul *Acetobacter*, care-l transformă în oţet.

2) *Un microorganism poate degrada sau neutraliza un factor antimicrobian activ asupra unui microorganism aparţinînd altei specii.* Astfel, unele bacterii şi fungi pot descompune fenolii şi acidul benzoic, ceea ce permite creşterea microorganismelor inhibate de prezenţa în mediu a acestor compuşi. De asemenea, unele microorganisme pot neutraliza activitatea antimicrobiană a majorităţii antibioticelor, fie prin degradarea lor sub acţiunea unor enzime adecvate (de exemplu, *penicilinaza*), fie prin utilizarea lor în metabolismul celular.

3) *Un microorganism alterează mediul din punct de vedere fizic, creînd astfel condiţii de creştere pentru microorganismul asociat.* Drojdiile osmofile, care cresc în soluţii concentrate de zahăr, modifică aceste soluţii prin fermentaţii şi oxidări în aşa fel încît le fac favorabile pentru dezvoltarea unor organisme mai puţin osmotolerante. Pe de altă parte, drojdiile nu pot creşte în pulpa cu structura celulară a fructelor normale, decît după alterarea acestei structuri de către anumite mucegaiuri.

4) *Unul dintre microorganisme modifică mediul din punct de vedere fiziologic, făcîndu-l potrivit pentru creşterea altora.* Microorganismele aerobe scad potenţialul redox al mediului, creînd astfel condiţii favorabile pentru anaerobi, ceea ce explică posibilitatea dezvoltării microorganismelor obligat anaerobe în medii aerobe cum este solul; în procesul de panificaţie bacteriile lactice coboară *p*H-ul mediului, care devine în felul acesta favorabil pentru creşterea drojdiilor.

Relaţiile de metabioză se întîlnesc şi la nivel molecular: *virusul satelit al tutunului* (VST) se replică în celulele-gazdă numai atunci cînd este asociat cu *virusul necrozei tutunului* (VNT) (B a w d e n, 1964). Fenomenul se datoreşte faptului că VST, lipsit de informaţia genetică necesară pentru sinteza proteinei-enzimă care iniţiază replicarea acidului nucleic, are nevoie ca această enzimă să-i fie furnizată de virusul asociat.

Sinergismul microbian. Cînd două sau mai multe tipuri de microorganisme se găsesc împreună în acelaşi mediu, ele pot avea activităţi combinate siner-

gice, foarte diferite cantitativ sau calitativ de activităţile însumate ale aceloraşi organisme crescute separat în mediul respectiv. Sinergismul microbian este deci o *relaţie de tip cooperant,* în cadrul căreia activitatea vitală comună a două sau mai multe specii de microorganisme are un efect pe care fiecare în parte nu l-ar putea realiza. Rezultatul ultim al acestei forme de asociaţie poate fi sinteza unor compuşi organici cu structură complicată, degradarea sau distrugerea unor substanţe complexe, sau determinarea la om sau la animale a unei boli pe care, izolat, nu ar putea-o provoca nici unul dintre parteneri.

Fenomene de sinergism pot fi observate curent în asociaţii de microorganisme de tipul lichenilor, unde se formează anumiţi acizi organici, pigmenţi şi corpi reproducători complecşi, care nu pot fi elaboraţi de nici unul din cei doi parteneri consideraţi separat. Relaţii de asemenea tip se întîlnesc şi în lumea bacteriilor şi se pot constitui uneori chiar între acestea şi entităţile acelulare care sînt virusurile.

Pseudomonas aureofaciens var. *nonliquefaciens* şi *P. fluorescens* nu au activitate lecitinazică şi de aceea reacţia cu gălbenuşul de ou, care pune în evidenţă prezenţa lecitinazei, este negativă la aceste specii. Cultivate împreună ele dau însă o reacţie intensă, care se produce chiar atunci cînd coloniile lor au crescut la distanţe de cîţiva milimetri. Este probabil că bacteriile din cele două specii produc anumite substanţe difuzabile, inactive ca atare dar capabile de a forma un complex enzimatic activ prin combinare între ele (B a t e s).

Haemophilus influenzae, bacterie nepatogenă pentru porc, acţionînd sinergic cu un virus, de asemenea nepatogen pentru acest animal, determină gripa porcină, boală febrilă evoluînd cu o pneumonie deseori mortală.

Fenomenele de simbioză şi sinergism microbian sînt deosebit de importante din punct de vedere biologic, deoarece existenţa microorganismelor heterotrofe, care au totdeauna anumite incapacităţi de sinteză, este asigurată de suplinirea acestor deficienţe prin activitatea biosintetizantă a unor microorganisme asociate.

Interdependenţele de ordin nutriţional ale diferitelor microorganisme au dat naştere în cursul evoluţiei la un număr mare de asociaţii simbiotice.

Relaţiile de tip antagonic. În cadrul acestor relaţii una dintre specii se comportă ca agresor şi profită de pe urma asociaţiei cu cealaltă, care este victimă şi, în consecinţă, este prejudiciată. Ele pot avea aspecte foarte diferite de la caz la caz, ilustrînd fenomene de *prădătorism* şi *parazitism* extern sau intracelular, însoţite frecvent de bacterioliză, competiţie şi concurenţă vitală sau antagonism propriu-zis.

1) *Prădătorismul* reprezintă manifestarea unei relaţii de *agresiune* în care unele microorganisme mobile, lipsite de perete celular rigid, captează, ingerează şi digeră microorganisme de dimensiuni mai mici, tipice în această privinţă fiind protozoarele bacterivore, care se hrănesc cu bacterii vii. Microorganismele cu perete celular rigid, cum sînt bacteriile, fungii şi algele, nu pot fi prădătoare datorită faptului că rigiditatea peretelui lor nu permite ingestia unei hrane particulate sau a macromoleculelor.

2) *Interacţiuni microbiene cu efect litic. Parazitismul.* Liza unei celule microbiene prin acţiunea unui microorganism asociat sau a unei entităţi infec-

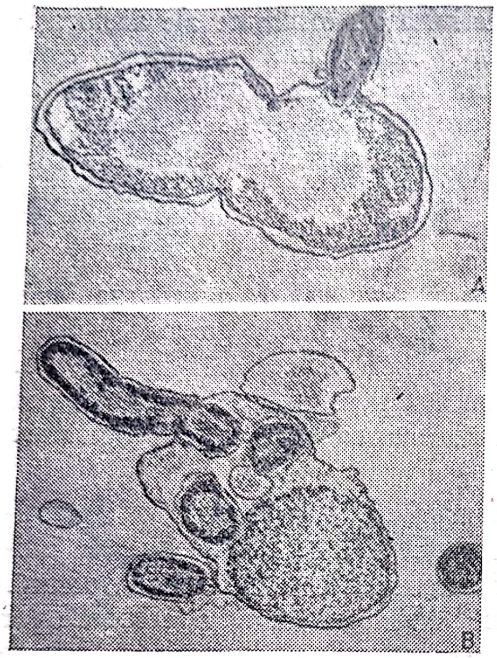


Fig. 363. Interacţiunea parazitară între bacteriile *Bdellovibrio bacteriovorus* şi *Erwinia amylovora:*
A — pătrunderea bacteriei agresoare printr-un por; *B* — invadarea celulei-gazdă (după Starr).

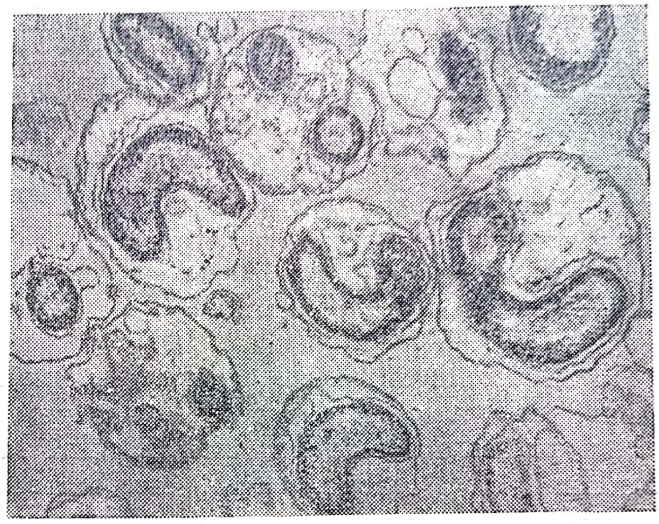


Fig. 364. Faza finală a interacţiunii dintre *B. bacteriovorus* şi *E. amylovora:* sferoplaşti de *Erwinia*, în diferite faze premergătoare dezintegrării, în care s-a dezvoltat bacteria agresoare (după Starr).

ţioase virale — bacteriofagul — reprezintă un caz particular de antagonism microbian, care poate fi observat fie atunci cînd cei doi parteneri ai relaţiei antagoniste sînt cultivaţi asociat, fie atunci cînd specia sensibilă este cultivată în prezenţa produşilor metabolici sau a extractelor antagonistului. *Bacterioliza* este un tip particular de moarte celulară, fără echivalent la plante şi animale, caracterizată prin faptul că abolirea funcţiilor vitale (metabolism, creştere şi reproducere) este însoţită de dizolvarea concomitentă, bruscă a celulei, ca urmare a unor alterări profunde ale învelişurilor celulare. Fenomenul tipic este ilustrat de relaţia fag virulent — bacterie sensibilă, în care celula infectată sintetizează sub controlul genomului fagic o enzimă litică de tipul lizozimului, care are ca substrat componenta mureinică a peretelui celular.

Acest tip de relaţii este întîlnit şi la alte categorii de microorganisme. Astfel bacteriile micolitice pătrund în interiorul miceliilor fungice, se multiplică acolo şi elaborează chitinaza — enzimă activă asupra chitinei parietale, ceea ce are ca efect liza peretelui celular şi moartea ciupercii. Relaţia are un caracter de *parazitism* determinat de faptul că multiplicarea agresorului este condiţionată de utilizarea constituenţilor celulari ai victimei sale.

— B a c t e r i o l i z a şi p a r a z i t i s m u l c u c o n t a c t c e l u l a r. Un caz unic de bacterioliză este acela al *lizei* unei celule bacteriene produsă din interiorul ei *(lysis from within)* de către o altă bacterie. *Bdellovibrio bacteriovorus,* specie prezentă în sol şi în apele de canal, este un *endoparazit* bacterio-

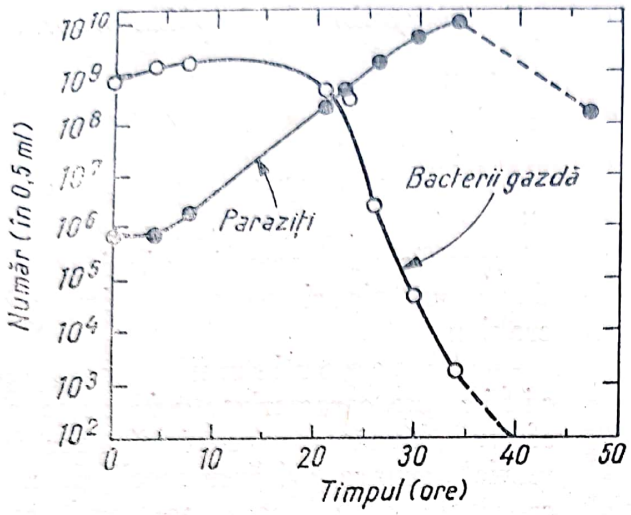


Fig. 365. Cinetica dezvoltării bacteriei *B. bacteriovorus* pe bacteria *E. amylovora* (după Stolp).

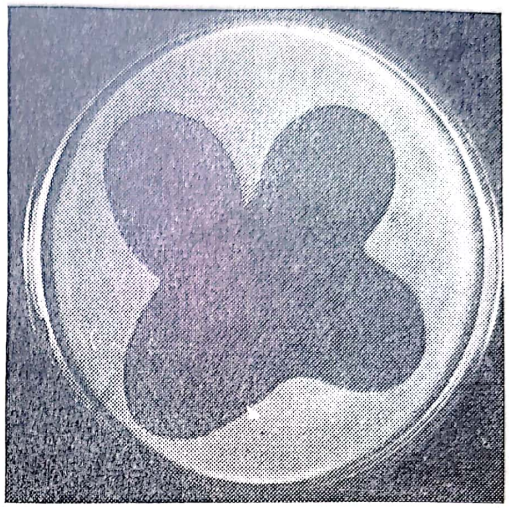


Fig. 366. Acţiunea litică a bacteriei *B. bacteriovorus* asupra unei culturi de *E. coli B.* Acţiunea este evidenţiată prin depunerea cîtorva picături dintr-o suspensie care conţine bacteria parazită pe suprafaţa unei culturi de *E. coli* (după Stolp şi Starr).

litic, capabil să exercite asupra unor specii bacteriene Gram-negative un atac fizic direct, urmat de fixarea parazitului pe celula-gazdă sensibilă, avînd ca efect, după scurt timp, liza acesteia. Două cîteva minute de la contactul cu agresorul lor celulele sensibile se transformă în sferoplaşti osmotic sensibili care suferă liza.

Procesul este strict limitat la celulele pe care s-au fixat paraziţii şi nu poate fi indus în extractul acelular al acestora. Datele de microscopie electronică arată că după atacul mecanic direct, în care parazitul se comportă ca un proiectil, sau după o acţiune de sfredelire a peretelui celular asociată poate cu injectarea unei substanţe litice neidentificate, parazitul pătrunde în întregime în celula-gazdă, determinînd dezorganizarea structurilor ei şi digestia conţinutului celular, ceea ce are ca urmare multiplicarea parazitului, cu creşterea relativă a populaţiei sale.

— B a c t e r i o l i z a f ă r ă c o n t a c t c e l u l a r a fost observată în cazul mixobacteriilor, organisme larg răspîndite în sol şi în apă. Acest proces poate fi evidenţiat aşezînd o cantitate mică de sol (în care se găsesc mixobacterii) în centrul unei plăci „însămînţate" în pînză cu alte bacterii: în jurul coloniilor de mixobacterii care se dezvoltă centrifug apar zone de liză evidente, datorită elaborării şi excretării de către mixobacterii a unor enzime litice difuzibile de tip *proteolitic* şi *murolitic*, care atacă pereţii celulelor sensibile (bacterii în special Gram-negative dar şi Gram-pozitive) la nivelul legăturilor peptidice. Mixobacteriile se răspîndesc treptat, prin alunecare pe suprafaţa gelozei, determinînd liza bacteriilor însămînţate pe ea şi consumînd substanţele nutritive astfel eliberate.

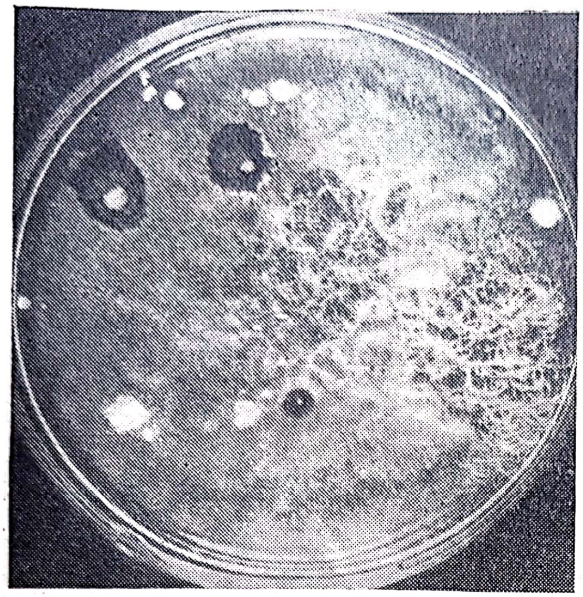


Fig. 367. Fenomenul Fleming. Cultură pe geloză de *Bacillus mycoides* din sol. Se observă prezenţa a trei colonii de bacterii cu proprietăţi antagoniste, care determină o inhibiţie a creşterii culturii în jurul lor (după Frobisher).

3) *Antagonismul microbian propriu-zis* reprezintă relaţia din cadrul unei asociaţii în care o specie microbiană exercită o acţiune defavorabilă asupra celeilalte, indiferent dacă procesul are loc în medii artificiale, în organisme vii sau în natură (W a k s m a n). După specificitatea acestei acţiuni se disting două tipuri de antagonism microbian.

— A n t a g o n i s m u l n e s p e c i f i c este caracterizat prin aceea că efectul dăunător se exercită nepreferenţial, asupra oricărei specii de microorganism cu care agresorul sau produsele sale de metabolism vin în contact. El se poate realiza în special pe două căi: *a*) *modificarea biochimică a mediului* prin acumularea de produse de metabolism toxice pentru speciile asociate (de exemplu, apariţia în mediu a alcoolului sau a acizilor lactic ori butiric, formaţi în timpul unor fermentaţii provoacă moartea microorganismelor asociate cu agentul fermentaţiei respective; *b*) *competiţia pentru o anumită substanţă nutritivă*, existentă în mediu în cantităţi limitate, între specii care au necesităţi de viaţă asemănătoare, dar un ritm diferit de reproducere: specia care creşte mai repede epuizează disponibilităţile nutritive ale mediului, împiedicînd astfel dezvoltarea speciei cu multiplicare lentă. Un exemplu îl constituie inhibiţia dezvoltării actinomicetelor în prezenţa unor bacterii nesporulate. Fenomenele de inhibiţie nespecifică, al căror substrat este acaparare a mediului de cultură de către un anumit microorganism, în dauna altuia cu care el este asociat, sînt cuprinse sub denumirea generică de *concurenţă vitală*. Consecinţa lor poate fi simpla dominare numerică a unei specii asupra alteia, sau eliminarea totală a speciei-victimă de către concurentul său.

— A n t a g o n i s m u l s p e c i f i c se exercită prin eliberarea în mediul comun de viaţă a unor substanţe caracteristice speciei producătoare, care au o acţiune defavorabilă selectivă asupra altor specii; asemenea substanţe sînt cunoscute sub denumirea de *antibiotice*.

Acest tip de antagonism poate fi întîlnit între reprezentanţi ai următoarelor grupe de microorganisme, asociaţi în toate combinaţiile posibile: eubacterii, actinomicete, fungi, alge şi protozoare. Unele microorganisme cu proprietăţi antagoniste pot chiar să producă pînă la 5—6 substanţe antibiotice, diferite ca structură chimică şi mod de acţiune biologică.

4) *Antagonismul prin bacteriocine: colicinele şi alte bacteriocine*. În 1925, G r a t i a a descris un tip particular de antagonism extrem de specific între două tulpini diferite de *E. coli*, exercitat prin intermediul a una sau mai multe

substanțe antibiotice difuzibile și termostabile, care în 1964 au primit numele de *colicine* (Gratia și Fredericq). Substanțe analoge colicinelor au fost găsite și la alte grupuri de bacterii, în afara celor intestinale, și au primit denumirea generică de *bacteriocine* (Jacob, Lwoff, Siminovitch, Wolman). În raport cu specia producătoare ele sînt denumite *piocine (Pseudomonas aeruginosa), megacine (B. megaterium), pesticine (Pasteurella pestis), subtilicine (B. subtilis)* etc.

Bacteriocinele se fixează inițial pe suprafața bacteriilor sensibile, la nivelul unor receptori specifici, după care, printr-un proces necunoscut, probabil enzimatic, determină moartea acestor celule. Fixarea unui număr suficient de mare de „particule" antibiotice pe bacterii produce o modificare profundă a metabolismului lor, cu diminuarea progresivă a biosintezei de ADN și ARN, avînd ca urmare oprirea creșterii normale și a diviziunii celulare. Sub acțiunea colicinelor și a altor bacteriocine elaborate de bacteriile Gram-negative, se observă o mărire lentă, progresivă a volumului celulei, ceea ce, la un moment dat, provoacă ruperea peretelui celular, astfel că în cîteva ore sau zile survine bacterioliza. Bacteriocinele germenilor Gram-pozitivi au, dimpotrivă, o acțiune mai rapidă și mai brutală.

Bacteriocinele produse de germenii Gram-negativi au un spectru de activitate restrîns, care se limitează la bacteriile aparținînd speciei producătoare sau unor specii și genuri foarte apropiate taxonomic. Bacteriocinele germenilor Gram-pozitivi sînt lipsite de specificitate și, ca urmare, au un spectru de activitate foarte întins, implicînd bacterii Gram-pozitive foarte îndepărtate sistematic de specia producătoare.

În ceea ce privește caracteristicile structurale ale bacteriocinelor, demnă de reținut este natura particulată a piocinelor, substanțe cu greutate moleculară de 8×10^6. Examinate la microscopul electronic, ele apar sub forma unor bastonașe de mărime uniformă (15 m$\mu \times$100 mμ), asemănătoare cozilor de bacteriofagi. Sub raportul compoziției chimice, colicinele sînt substanțe glucidolipidopolipeptidice, în timp ce bacteriocinele germenilor Gram-pozitivi sînt de natură proteică.

Bacteriocinele sînt produse numai de anumite tulpini ale unei specii, tulpini care au proprietatea de bacteriocinogeneză. Biosinteza acestor substanțe cu efect antibiotic este condiționată de prezența în celula bacteriană a unor determinanți genetici speciali, din categoria episomilor și plasmidelor, așa cum este, de exemplu, factorul de colicinogeneză *„col"* constituit din circa 1×10^5—3×10^5 perechi de nucleotide. Acest determinant genetic special se replică autonom în citoplasmă, independent de replicarea cromozomului bacterian și poate fi transferat de la o bacterie la alta, prin conjugare sau prin transducție. După transferul factorului „col", celula receptoare devine capabilă să sintetizeze o colicină identică aceleia pe care o forma celula donatoare.

Caracteristica principală a colicinelor, care le deosebește fundamental de alte antibiotice, constă în aceea că sinteza lor este letală pentru celulele în care s-a efectuat și că proprietatea de colicinogeneză nu se poate perpetua într-o cultură bacteriană decît în starea ei potențială. Periodic, acest caracter letal potențial devine actual, ceea ce se manifestă prin formarea de particule antibiotice care produc moartea și liza propriei lor celule de origine, liberîndu-se astfel în mediu. Celulele colicinogene, care posedă factorul genetic „col", nu sînt însă sensibile la acțiunea antibiotică a colicinei omologe, elaborate de alte

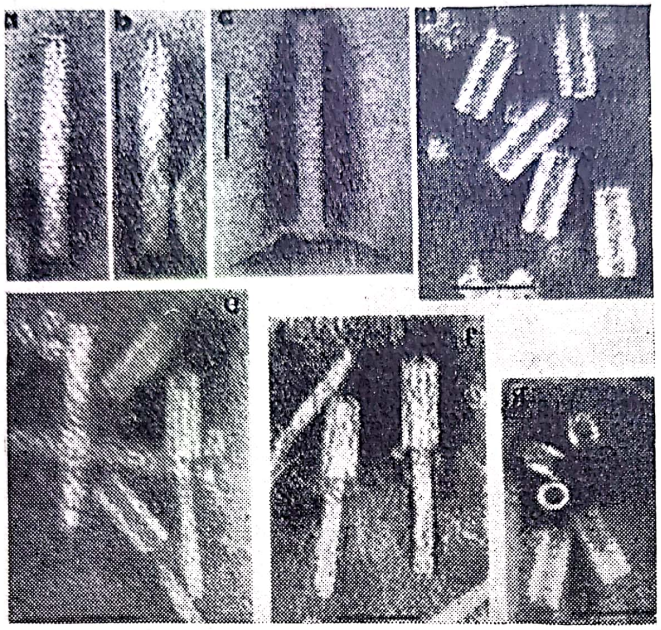


Fig. 368. Aspecte electronooptice ale piocinelor: *a*—*g* — forme bacilare striate, forme de tub gol şi forme cu aspect de teacă de bacteriofag contractată (după Bradley).

celule puntătoare ale aceluiaşi factor, ca şi cum prezenţa acestui caracter letal potenţial le-ar fi făcut imune la acţiunea exogenă a colicinei corespunzătoare. O dată eliberată în mediu, o anumită colicină are deci efect antibiotic numai asupra celulelor de aceeaşi specie, care nu o pot, la rîndul lor, elabora, fiind lipsite de factorul „col" respectiv.

Simbioza şi parazitismul intracelular. Unele microorganisme sînt parazite obligate, în sensul că nu se pot dezvolta decît în celule vii sau pe seama substanţelor nutritive derivate direct dintr-o celulă-gazdă vie (T r a g e r).

Multiplicarea intracelulară a microorganismelor reprezintă pentru ele o specializare ecologică extremă, care poate avea pentru organismul gazdei un efect fie benefic, fie, mai ales, patogen. Localizarea celulară a parazitului este în mod obişnuit intracitoplasmatică, dar ea poate fi şi intranucleară, aşa cum se întîmplă în cazul unor rickettsii, ca şi în acela al anumitor virusuri. Simbiontului sau parazitului, vulnerabil în condiţiile mediului extracelular, celula-gazdă îi asigură apărarea de factori nocivi ca şocul osmotic, activitatea fagocitară, acţiunile enzimatice, antibiotice sau imunologice, furnizîndu-i în acelaşi timp substratul nutritiv sau chiar întregul aparat celular de biosinteză şi oferindu-i condiţii de presiune osmotică, vîscozitate şi *p*H adecvate. Simbionţi sau paraziţi intracelulari sînt de exemplu, bacteriofagii pentru bacterii, bacteriile din genul *Rhizobium* pentru celulele radiculare ale leguminoaselor, rickettsiile şi bacilul leprei *(Myc. leprae)* pentru celulele animale, fungii de micorize şi cei producători de rugini pentru celulele vegetale, precum şi algele zoochlorele *(Chloroplyceae)* şi zooxanthele *(Chrysophyceae)* pentru nevertebratele acvatice.

Efectele unei asemenea relaţii pentru celula-gazdă sînt izolate sau asociate. Ele pot consta în distrugere şi liză, ca în cazul parazitării cu fagi sau cu alte virusuri, în modificări structurale de tip hipertrofic (mărirea dimensiunilor celulei) sau hiperplazic (intensificarea multiplicării celulare într-un ţesut cu celule parazitate), aşa cum se întîmplă sub acţiunea bacteriilor de nodozităţi, în alterarea şi devierea metabolismului celular sub controlul informaţiei genetice a parazitului, ca în sistemul virus-bacterie gazdă, şi chiar în relaţii simbiotice de tipul mutualismului, ca în cazul unor ecosisteme cum sînt: micorizele, nodozităţile bacteriene ale leguminoaselor şi micetoamele insectelor.

NOŢIUNI DE MICROBIOLOGIE MEDICALĂ ŞI IMUNOLOGIE

I. CARACTERELE GENERALE ALE MICROORGANISMELOR PATOGENE

Dintre nenumăratele specii de microorganisme existente în natură, numai un număr foarte limitat sînt capabile să se dezvolte în asociaţie cu organismul animalelor superioare şi al omului, iar dintre acestea, un număr şi mai restrîns, aproximativ 300 de specii (după Z i n s s e r) ar fi patogene.

Patogenitatea bacteriilor este legată, în general, de parazitismul lor, fără însă ca aceste două caractere să fie întru totul superpozabile. În mod obişnuit, speciile strict saprofite, care se hrănesc numai cu substanţa organică neanimată şi care nu pot creşte pe seama ţesuturilor vii, au o mică importanţă ca agenţi patogeni. Există totuşi specii saprofite, care în anumite condiţii pot deveni patogene şi chiar un saprofit strict cum este *Cl. botulinum* poate fi patogen, în mod indirect, printr-un produs al metabolismului său — *exotoxina botulinică.*

Pe de altă parte, marea majoritate a bacteriilor patogene sînt parazite, facultativ saprofite, deoarece pot să se dezvolte pe medii organice în condiţii de laborator.

Bacteriile patogene au două proprietăţi caracteristice: *patogenitatea* şi *virulenţa,* prin care se deosebesc de cele nepatogene.

1. PATOGENITATEA

Proprietate esenţială a oricărui agent infecţios, patogenitatea poate fi definită drept aptitudinea lui de a determina, în mod natural sau în condiţii experimentale, apariţia unui proces infecţios de obicei decelabil din punct de vedere clinic, cu alte cuvinte drept capacitatea lui de a produce o *boală* la o anumită specie gazdă.

Patogenitatea este un caracter de specie, care a apărut în procesul de evoluţie şi constă în însuşirea potenţială a speciei respective de a produce o boală la organisme receptive. Unele organisme sînt totdeauna nepatogene (*Azotobacter, Nitrobacter, Acetobacter* etc.), datorită incapacităţii lor de a se stabili şi a se multiplica într-un organism animal sau vegetal, în timp ce altele sînt patogene (*Corynebacterium diphtheriae, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella*

typhi, *Bacillus anthracis*), deşi unele tulpini ale speciilor respective nu produc boală decît dacă sînt inoculate în doze mari sau dacă organismul-gazdă are o rezistenţă generală foarte scăzută.

Adaptarea unui microorganism ca agent patogen pentru om, animale sau plante nu implică un grad foarte ridicat de patogenitate, pentru că tocmai tulpinile patogene, care determină mortalitate foarte mare printre organismele infectate, supraviețuiesc mai greu în natură şi, de aceea, diseminarea lor este limitată şi uneori chiar încetează complet. Din acest punct de vedere, agenţii patogeni cei mai bine adaptaţi pentru a supravieţui sînt cei care provoacă infecţii uşoare, cu un mare procent de îmbolnăviri subclinice şi care creează o imunitate slabă şi de scurtă durată.

2. VIRULENŢA

În prezent nu există o definiţie unanim acceptată a virulenţei. Cei mai mulţi autori admit însă că virulenţa exprimă capacitatea unei tulpini date a unui microorganism patogen, aflată într-o anumită fază de creştere, de a se adapta, de a se multiplica şi de a determina o stare patologică la o anumită gazdă, atunci cînd este introdusă în organismul acesteia în condiţii bine definite. Această definiţie ecologică precizează relaţia obligatorie dintre particularităţile parazitului şi cele ale gazdei în determinarea bolii, ca şi a gradului ei de gravitate.

Rezultantă a interacţiunii unor factori care ţin atît de parazit cît şi de gazdă, virulenţa este deci o proprietate care exprimă cantitativ *gradul de patogenitate* al unei tulpini pentru o anumită gazdă şi este determinată de însumarea unor însuşiri diferite şi independente, cum sînt *capacitatea de invazie*, *toxigenitatea* şi *infecţiozitatea*. Datorită acestor însuşiri agentul patogen poate să reziste mecanismelor de apărare celulare şi umorale ale gazdei, care îl atacă imediat după ce a pătruns în ţesuturi, şi este capabil să se adapteze, să se multiplice şi să determine tulburări patologice care duc la apariţia stării de boală.

Însă, spre deosebire de patogenitate, virulenţa nu este o proprietate de specie, ci una individuală, de tulpină. Această proprietate este variabilă nu numai de la o tulpină la alta, ci — în timp — chiar la aceeaşi tulpină. Diferitele proprietăţi ale microorganismului care condiţionează virulenţa lui pot suferi variaţii independente unele de altele.

a. Factorii care condiţionează virulenţa

Agresivitatea. Puterea de invazie sau agresivitatea (invazivitatea) reprezintă capacitatea agenţilor patogeni de a pătrunde în ţesuturile gazdei şi de a se multiplica în ele, producînd prin aceasta efecte nocive pentru organismul-gazdă; ea se traduce, în general, prin modificarea integrităţii ţesutului conjunctiv. Bacteriile care au o mare putere de invazie, sînt înzestrate cu însuşirea de a elabora substanţe numite *factori de difuziune*. Substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv opune o rezistenţă însemnată la pătrunderea agen-

ţilor patogeni, datorită conţinutului său ridicat de acid hialuronic sub formă vîscoasă, polimerizată. Unele bacterii virulente datoresc puterea lor de invazie capacităţii de a sintetiza *hialuronidaza*, enzimă care catalizează hidroliza polimerilor de acid hialuronic, determinînd astfel o fluidificare a substanţei fundamentale, favorabilă răspîndirii bacteriilor în ţesut.

Bail şi Weill (1911) au descris *agresinele*, substanţe produse de numeroşi agenţi patogeni (*B. anthracis, Staphylococcus aureus, C. diphteriae, Myc. tuberculosis* etc.) şi eliberate în cursul procesului de multiplicare a bacteriilor sau prin autoliza acestora. Agresinele nu sînt citotoxice în sine sau au efecte lezante directe minime, însă, datorită proprietăţii lor de a interfera cu mecanismele de apărare ale gazdei, potenţează acţiunea agenţilor patogeni, favorizînd multiplicarea lor rapidă. Astfel, inoculate împreună cu o doză subletală de bacterii, ele contribuie la îmbolnăvirea mortală a animalului; dacă sînt inoculate o dată cu cantitatea de germeni care produc moartea animalului, după o infecţie cu evoluţie îndelungată ele grăbesc această evoluţie, determinînd o boală scurtă urmată de moarte.

Bacteriile care au o mare putere de invazie provoacă în general infecţii generalizate ale organismului. Agresivitatea nu este însă o proprietate obligatorie pentru bacteriile capabile să determine boli grave sau mortale. Numeroase bacterii sînt lipsite de putere de invazie şi de aceea generează numai infecţii locale, dar elaborează toxine foarte puternice încît provoacă moartea prin intoxicaţie generală.

Toxigenitatea. Simpla prezenţă a unui număr mare de bacterii în ţesuturi sau umori — condiţionată de agresivitatea lor — nu este suficientă pentru a explica fenomenele patologice care se observă la animalele infectate. Substratul tulburărilor care caracterizează boala infecţioasă este de ordin biochimic şi rezultă dintr-o acţiune complexă, determinată de prezenţa şi multiplicarea agentului patogen în organism, însoţită de obicei de producerea unor substanţe dotate cu o puternică acţiune toxică — *toxinele bacteriene* — care determină cele mai multe din manifestările patologice respective. În alte cazuri, parazitul poate libera produse metabolice care, fără a fi prin ele însăle toxice, alterează desfăşurarea normală a metabolismului tisular. În sfîrşit, procesele fiziologice normale ale gazdei sînt deseori tulburate ca urmare a competiţiei cu bacteriile pentru un factor metabolic esenţial în procesele lor vitale.

Toxinele bacteriene au fost descoperite în 1888 de Roux şi Yersin, care au demonstrat că unele specii bacteriene elaborează substanţe toxice care provoacă leziuni şi simptome caracteristice pentru bolile respective şi, uneori, produc chiar moartea animalelor la care sînt inoculate. În general, pentru a-şi exercita acţiunea, compuşii toxici din celulele bacteriene trebuie să fie eliberaţi din celulele în care s-au format şi trecuţi în soluţie în umorile organismului animal.

Toxigenitatea bacteriilor variază, în cadrul aceleiaşi specii, de la o tulpină la alta şi este în funcţie de condiţiile de mediu în care cresc germenii respectivi. Capacitatea de a elabora toxine nu este însă limitată la bacteriile patogene parazite. Numeroşi germeni saprofiţi pot elabora diferite tipuri de substanţe toxice, uneori foarte puternice, aşa cum este, de exemplu, toxina sintetizată de *Cl. Botulinum*.

După natura lor chimică, după relaţia în care rămîn cu celula microbiană producătoare sau după mecanismul prin care acţionează asupra organismului-gazdă, toxinele bacteriene pot fi clasificate în mai multe tipuri: *toxine de natură proteică* şi *toxine cu structură mai complexă*, *exotoxine* şi *endotoxine*, sau, în sfîrşit, *toxine celulare propriu-zise* (hemolizine, leucocidine) şi *toxine-enzime*, capabile de a influenţa profund reactivitatea celulară sau tisulară faţă de agentul patogen.

b. Exotoxinele bacteriene

Exotoxinele sînt substanţe toxice solubile, elaborate de celula bacteriană şi *eliminate la exterior*, în mediul de cultură sau în organismul infectat. Agenţii patogeni care elaborează exotoxine, în general bacterii Gram + (cu excepţia speciei Gram — *Shigella dysenteriae*) rămîn de obicei localizaţi la poarta lor de intrare în organism, exercitîndu-şi efectul toxic la distanţă.

Exotoxinele sînt substanţe de natură *proteică* şi, ca atare, termolabile. Toxicitatea acestor substanţe nu poate fi explicată prin compoziţia lor, care constă în aminoacizi obişnuiţi. Ea ar fi determinată de configuraţia spaţială a acestora şi a lanţurilor polipeptidice pe care ei le formează în molecula proteică şi poate fi abolită prin alterarea acestei configuraţii.

Eliberarea celor mai multe exotoxine în mediul înconjurător se produce în faza de multiplicare bacteriană activă, astfel încît concentraţia lor în mediu este maximă atunci cînd creşterea bacteriilor este maximă sau puţin după aceea. S-a mai demonstrat că unele exotoxine nu ajung în mediu numai ca produse de secreţie ale bacteriilor, ci sînt liberate şi prin distrugerea autolitică a celulelor bacteriene. Astfel, în timp ce la unele specii *(Cl. tetani)*, cantităţi mari de toxine părăsesc celulele intacte printr-un proces de difuziune, la altele (*Corynebacterium diphteriae*) corpii microbieni reţin o cantitate însemnată de exotoxină, care nu este liberată în mediu decît după distrugerea lor, produsă prin autoliză sau sub acţiunea a diferiţi alţi factori.

Comparativ cu alte substanţe toxice, exotoxinele bacteriene au o toxicitate foarte mare, atît în stare brută (filtrate de cultură) cît şi, mai ales, în stare purificată. În cazul toxinelor *nepurificate* (filtrate de cultură), cantitatea de toxină care omoară 50% din cobaii infectaţi (DL_{50}) este de 0,002 ml pentru toxina difterică, 0,005 ml pentru cea tetanică şi 0,0001 ml pentru toxina botulinică. Exotoxinele foarte *purificate* au efectul toxic cel mai impresionant, după cum reiese din tabelul 23. Toxina botulinică de tip *A* purificată şi cristalizată conţine într-un miligram 1 200 000 DLM (doze limite mortale) pentru 1 kg corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg toxină poate să omoare 1 200 tone de cobai sau 2 milioane de şoareci; după calculele lui Van Heyningen, circa 198,422 g din această exotoxină ar fi suficiente pentru a omorî toată populaţia globului.

Sensibilitatea diferitelor specii animale faţă de acţiunea exotoxinelor este diferită. Astfel, efectul letal la cobai şi la şoarece se obţine cu 4 şi respectiv 8 molecule de exotoxină botulinică pentru fiecare celulă nervoasă. Ţinînd seama de faptul că fiecare dintre aceste animale au circa 2 500 000 de celule

TABELUL 23

TOXICITATEA DIFERITELOR TOXINE BACTERIENE ÎN RAPORT CU TOXICITATEA UNOR TOXICE CHIMICE

Substanţa	Doza mortală în mg calculată pentru om	Indice de toxicitate în raport cu stricnina
Stricnină	40	1
Arsenic	1 400	0,03
Crotactină (venin şarpe)	4	10
Ricin (toxină vegetală)	2	20
Exotoxină difterică	0,02	2 000
Exotoxină tetanică	0,00006	700 000
Exotoxină botulinică	0,00006	700 000
Endotoxine bacteriene (în general)	400	0,1

nervoase, rezultă că ele pot fi omorîte respectiv cu 10 şi 20 milioane de molecule exotoxină.

Efectul biologic al exotoxinelor este specific şi este datorit afinităţii lor caracteristice pentru anumite celule ale organismului. Exotoxina difterică, interferînd cu sistemul citocromic din celulele organismelor sensibile (şi în special

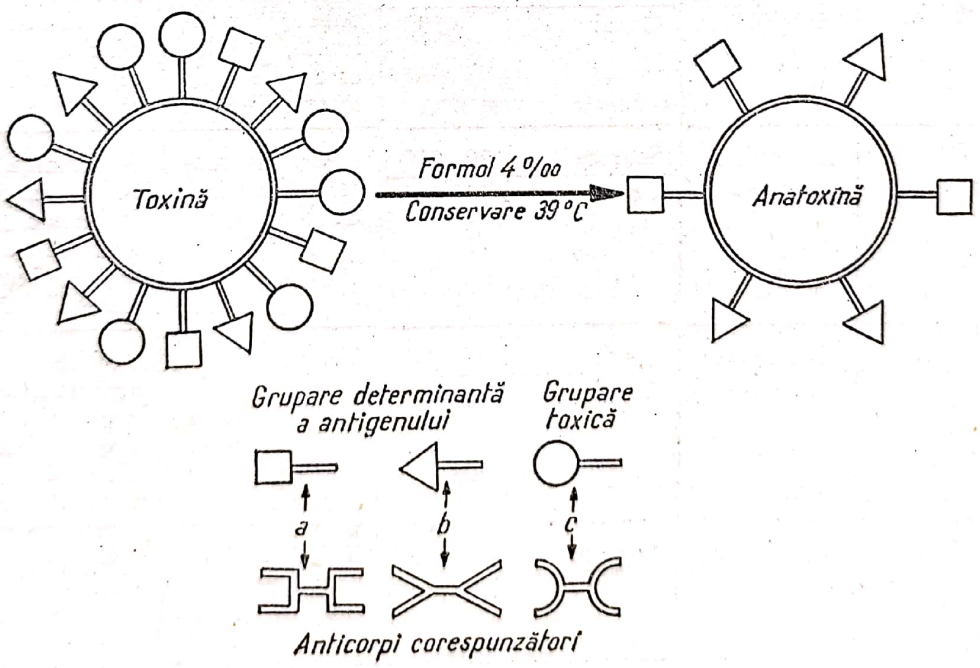


Fig. 369. Reprezentare schematică a procesului de transformare a exotoxinelor în anatoxine. Pentru simplificare, molecula de toxină este reprezentată ca avînd numai două tipuri de grupări antigenice (*a* şi *b*) şi un tip unic de grupări toxice (*c*).

cu citocromul *b*), lezează aproape toate tipurile de celule şi determină cu precădere necroze la locul de inoculare, leziuni hemoragice în glandele suprarenale şi leziuni în miocard.

Toxina tetanică afectează numai neuronii motori, care sub acţiunea ei induc o contracţie permanentă a muşchilor. Intoxicaţia progresează centripet: toxina difuzează de la locul ei periferic de formare, prin spaţiile ţesutului interneuronal şi propulsată prin presiunea exercitată de contracţia musculară ajunge în lichidul din ţesutul interstiţial al sistemului nervos central,la punctul de emergenţă din măduva spinării a trunchiurilor nervilor periferici. Toxina botulinică lezează sistemul nervos periferic, determinînd final paralizia muşchilor respiratori.

Efectul toxinelor, cu excepţia aceluia al toxinei letale stafilococice, se manifestă după o incubaţie relativ îndelungată, necesară pentru ca celulele sensibile să fixeze o cantitate suficientă de toxină din sînge şi limfă. Incubaţia poate fi scurtată, în anumite limite, prin mărirea dozei de toxină inoculată.

Sub influenţa combinată a formolului 4‰ şi a căldurii (39—40°C), exotoxina se transformă în *anatoxină* sau *toxoid*. Produsul astfel format este lipsit complet de toxicitate, însă păstrează intacte proprietăţile antigenice specifice

TABELUL 24

TOXICITATEA ŞI MODUL DE ACŢIUNE AL CÎTORVA TOXINE BACTERIENE

Bacteria producătoare	Toxina	Toxicitate DL 50 (1 mg//kg animal)		Locul de acţiune	Leziuni şi modificări produse
Corynebacterium diphtheriae	Exotoxina proteică	Şoarece	3	Locul de inoculare, suprarenale, miocard+efect citotoxic general	Necroză, inhibarea sintezei proteinelor şi a proceselor oxidative
		Cobai	3 500		
Clostridium tetani	Exotoxina proteică	Şoarece	200 000	Neuronii motori din axul cerebrospinal	Suprimarea inhibiţiei sinaptice (tetanospasmina) acţiune cardiotoxică şi hemolitică (tetanolizină)
		Cobai	1 200 000		
Clostridium botulinum	Exotoxina proteică	Şoarece	1 620 000	Terminaţiile nervoase colinergice din fibrele autonome periferice şi somatice	Acţiune paralitică; activitate anticolinergică; inhibarea liberării de acetilcolină
		Cobai	1 200 000		
Clostridium welchii	Lecitinaza	Şoarece	400	Lecitina din membranele celulare şi mitocondriale	Necroză şi citoliză
Salmonella typhi	Endotoxina (glucido-lipidopolipeptidică)			Fagocitele circulante şi SRE; capilarele sanguine mici	Inhibiţia fagocitozei; congestie şi hemoragie; şoc endotoxic etc.

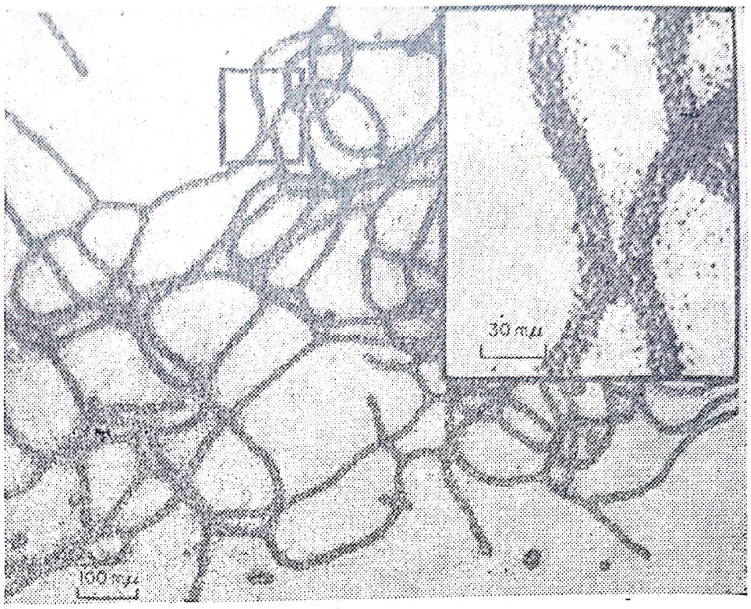


Fig. 370. Aspectul lipopolizaharidului de *Salmonella typhimurium* dotat cu activitate endotoxică şi de antigen „O" (microelectronografie).

exotoxinei din care provine. De aceea, introducerea parenterală a anatoxinelor în organismul uman sau animal determină formarea unei mari cantităţi de anticorpi de tipul antitoxinelor, substanţe capabile să neutralizeze complet efectele exotoxinei corespunzătoare. Această posibilitate de modificare calitativă a exotoxinelor are o foarte mare importanţă practică, anatoxinele putînd fi folosite ca vaccinuri.

În afară de efectul lor toxic selectiv, unele exotoxine au şi un caracter de histotoxicitate generală. Astfel, toxina difterică interferă cu sinteza citocromului *b*, foarte răspîndit ca pigment respirator, iar lecitinaza clostridiilor distruge fosfolipidele, care sînt componente structurale ale celor mai multe celule (tab. 24).

c. Endotoxinele bacteriene

Endotoxinele sînt substanţe toxice prezente, după cît se pare, la toate bacteriile Gram-negative şi care rămîn la locul de sinteză ca adevăraţi constituenţi structurali al celulei, din care sînt liberate numai după distrugerea ei prin autoliză sau prin diferite alte acţiuni fizice, chimice sau biologice.

Endotoxinele sînt complexe macromoleculare (cu g.m. 1—10 milioane), localizate în straturile externe ale peretelui celular şi constituite din fosfolipide, polizaharizi şi proteine. Lipopolizaharidul, care corespunde endotoxinei purificate, constituie fracţiunea toxică a endotoxinei; fracţiunea proteică este lipsită de toxicitate, iar polizaharidul reprezintă antigenul somatic „O" al bacteriilor Gram negative.

Endotoxinele sînt rezistente la acţiunea enzimelor proteolitice, sînt termostabile, nefiind inactivate decît după o oră de expunere la temperaturi ridicate (80—100° şi chiar 120°).

Endotoxinele au o toxicitate mult mai slabă în comparaţie cu aceea a exotoxinelor. Astfel, pentru şoarece, DLM este de 2 mg corpi microbieni de

meningococ şi 10 mg de gonococ. Doza letală medie este de 1 mg endotoxină/kg corp animal. Acţiunea lor toxică este neselectivă şi, ca urmare, toate endotoxinele determină o simptomatologie identică. Ele au un efect pirogen pronunţat — producînd hipertermie chiar după administrarea în doze minime — datorită perturbării mecanismelor de termoreglare din centrii encefalici (hipotalamus) prin intermediul unor substanţe pirogene liberate din leucocitele intoxicate. Acţiunea lor se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor, în care pătrund aproape instantaneu, determinînd dispariţia a aproximativ 60% din leucocitele sîngelui circulant şi retragerea lor în ţesutul pulmonar şi în alte organe. După circa 4 ore de la injectarea unei endotoxine, numărul leucocitelor din sîngele circulant, care mai întîi a scăzut masiv, ajunge să atingă un nivel anormal de ridicat, ca şi acela al hematiilor imature, ca urmare a eliberării forţate în torentul circulator a rezervelor celulare din centrii de formare şi depozitare a elementelor sangvine.

Datorită acţiunii rapide a componentelor toxice, endotoxinele măresc iniţial sensibilitatea organismului faţă de infecţii, după care, prin acţiunea componentei lor antigenice, determină, în mod obişnuit, o stare de rezistenţă relativ nespecifică (întrucît se manifestă în oarecare măsură şi faţă de endotoxine heterologe) cu durată variabilă. Injectarea lipopolizaharidului *E. coli* la şoarece produce imediat o scădere a rezistenţei antiinfecţioase a animalului (DL_{50} de *E. coli* ajunge să fie de o mie de ori mai mică decît în cazul animalelor normale), dar după 24 de ore se instalează la animal o stare de rezistenţă crescută (DL_{50} se ridică pînă la valori de 100 000 de ori mai mari).

Dozele mari, letale, produc aşa-numitul *şoc endotoxic*, caracterizat prin frison, febră, somnolenţă, inapetenţă, tulburări respiratorii (dispnee), tulburări de metabolism glucidic (hiperglicemie urmată de hipoglicemie), diaree sangvinolentă, leucopenie, paralizii şi moarte, la aproximativ 24 de ore după administrarea dozei letale. La necropsie se observă congestii generalizate şi hemoragii în intestinul subţire şi în alte organe interne, hepatosplenomegalie, leziuni vasculare şi tromboze.

Calităţile antigenice ale endotoxinelor sînt slabe, comparativ cu cele ale exotoxinelor. De asemenea, efectul protector al anticorpilor antiendotoxici este slab.

Sub acţiunea combinată a formolului şi a căldurii, toxicitatea lor diminuă mult, însă o dată cu aceasta dispar şi o bună parte din proprietăţile lor imunogene, ceea ce împiedică folosirea lor în practică sub formă de anatoxine (tab. 25).

d. Alte tipuri de toxine bacteriene

În afară de intoxicaţia produsă de toxinele tipice (exo- şi endotoxine), bacteriile mai pot produce tulburări în organism şi datorită aşa-numitelor *toxine-enzime*. Pe lîngă *lecitinază*, care în prezenţa Ca^{++} produce liza hematiilor (alterînd integritatea membranei lor) şi hidroliza lecitinei (substanţă implicată în cimentarea membranei celulare şi a membranelor mitocondriale), au mai fost descrise *colagenazele*, care dezintegrează fibrele de colagen, *dornazele* (*dezoxiribonucleaze*), care depolimerizează ADN (de exemplu, *strepto-*

TABELUL 25

PRIVIRE COMPARATIVĂ ASUPRA EXOTOXINELOR ŞI ENDOTOXINELOR BACTERIENE

Caracteristici generale	Exotoxine	Endotoxine
Origine	Bacterii Gram + (de exemplu *C. diphteriae*, *C. tetani*, *C. botulinum*, *S. aureus* etc.)	Bacterii Gram — (de exemplu *S. typhi*, *V. cholerae*, *N. meningitidis* etc.)
Localizare în raport cu celula bacteriană	Eliminate în mediul de cultură (concentraţia maximă după 5—7 zile)	Legate de celula bacteriană; liberate numai după distrugerea ei
Compoziţie chimică	Proteine	Complexe glucido-lipido-polipeptidice
Rezistenţa	Termolabile (60°C); se alterează prin păstrare la t° camerei, expunere U.V. Inactivate de enzimele proteolitice	Relativ termostabile. Rezistă la 60°, la păstrare la t° camerii, şi U.V. Nealterate de enzimele proteolitice
Natura efectului toxic	Efecte toxice specifice, caracteristice pentru fiecare toxină; incubaţie de obicei lungă	Efecte toxice nespecifice; incubaţie scurtă
Toxicitate pentru animale	Foarte mare	Relativ mică
Răspunsul la acţiunea formolului 4‰ şi la căldurii (39—40°C)	Se transformă în anatoxine (netoxice, dar antigenice)	Nu se transformă în anatoxine
Proprietăţi antigenice	Puternic antigenice. Induc formarea unor cantităţi mari de anticorpi (antitoxine neutralizante)	Slab antigenice. Induc formarea unor cantităţi mici de anticorpi
Valoare protectoare a anticorpilor antitoxici	Neutralizează total activitatea toxinei	Neutralizează numai o fracţiune din activitatea endotoxinei

dornaza produsă de streptococul hemolitic), *coagulazele*, care coagulează fibrinogenul chiar în plasma citratată, *streptokinaza* (fibrinolizina), care dizolvă cheagurile de fibrină etc. Aceste toxine-enzime nu omoară întotdeauna celulele, ele nici nu le atacă direct, ci acționează numai prin hidrolizarea unor substraturi prezente în mediul extracelular. Datorită acestui fapt ele influențează indirect evoluția infecției, așa cum, de exemplu, colagenaza și streptokinaza favorizează procesul infecțios, comportîndu-se ca factori de agresiune, prin modificarea caracteristicilor fizico-chimice ale mediului din jurul agenților patogeni.

Unele bacterii elaborează substanțe cu acțiune toxică selectivă asupra anumitor celule ale organismului-gazdă: asemenea produși microbieni sînt, de exemplu, *hemolizinele*, care lizează hematiile, și *leucocidinele*, care omoară leucocitele.

În sfîrșit, însăși multiplicarea bacteriilor în organism produce o serie de efecte toxice rezultînd din *competiția metabolică*. Acest fenomen constă din eliminarea unor produse de catabolism bacterian care afectează nutriția celulelor-gazdei, sau din acapararea de către bacterii a anumitor metaboliți importanți, necesari pentru fiziologia gazdei, care sînt folosiți pentru sintezele bacteriene sau sînt numai adsorbiți pe suprafața bacteriilor (de exemplu, ionii anorganici, diferite complexe organice etc.). Interferența metabolică sau competiția dintre bacterii și organismul-gazdă alterează temporar permeabilitatea și activitatea fiziologică a țesutului infectat și poate să producă indirect diferite fenomene toxice, locale sau generale.

Participarea celor doi factori principali ai virulenței — agresivitatea și toxigenitatea — în determinarea unei stări patologice este variabilă. Virulența unor agenți patogeni este condiționată în special de toxigenitate, a altora este în funcție de puterea de invazie, iar a altora de coexistența celor două proprietăți.

De exemplu, *Clostridium botulinum*, saprofit din sol, este o bacterie lipsită de aptitudinea de a invada un organism și de a se multiplica în țesuturile lui. În schimb, toxina botulinică, preformată într-un aliment contaminat, poate să producă o boală gravă, deseori mortală, care este o intoxicație similară acelora produse de toxinele vegetale sau de toxicele chimice.

Clostridium tetani, agentul patogen al *tetanosului*, este o bacterie foarte toxigenă, dotată în același timp cu o oarecare putere de invazie. El determină un focar de infecție localizat, condiționat de existența anaerobiozei create de distrugerea traumatică a țesuturilor sau de o infecție asociată, în care elaborează toxina care, ulterior, difuzează pe calea nervoasă periferică spre trunchiurile nervoase spinale.

Corynebacterium diphteriae, agentul patogen al *difteriei*, are de asemenea o putere de invazie redusă, deși mai mare decît aceea a bacilului tetanic. El se localizează de obicei în faringe, unde determină apariția unei leziuni caracteristice, dar are în același timp posibilitatea de a invada ocazional și alte țesuturi. Efectul patogen al multiplicării acestei bacterii este datorat tot toxinei formată la poarta de intrare, care difuzează după aceea în tot organismul pe cale sanguină.

O comportarea deosebită au agenţii patogeni ai *gangrenei gazoase (Welchia perfrigens, Cl. oedematiens)* şi streptococii, care sînt invazivi şi toxigeni, dar a căror acţiune toxică nu poate explica toate particularităţile bolilor respective.

În sfîrşit, într-o ultimă categorie se întîlnesc germeni ca pneumococul *(Diplococcus pneumoniae)* şi bacilul cărbunelui *(B. anthracis)*, al căror efect patogen pare a fi integral dependent de puterea lor de multiplicare şi răspîndire. Datorită acestui fapt, în infecţia cărbunoasă experimentală, moartea animalelor se produce numai atunci cînd numărul germenilor din sînge este extrem de mare şi cînd se realizează, probabil, o concentraţie letală de substanţe toxice sau de produse de catabolism nocive pentru gazdă. În unele cazuri, capilarele sînt pline de embolusuri de bacili, astfel că de multe ori moartea pare a fi provocată mai curînd de un blocaj mecanic al capilarelor (Van Heyningen).

3. INFECŢIOZITATEA

Capacitatea combinată de multiplicare activă în organismul-gazdă şi de toxinogeneză nu sînt totdeauna suficiente pentru a determina virulenţa unui germen. De exemplu, unele tulpini de pneumococ şi de streptococ din grupul *A*, inoculate intravenos la şoarece şi la iepure, produc septicemii fulgerătoare, deşi nu pot determina infecţii spontane, naturale.

Pentru a putea produce infecţia şi a se adapta la gazde noi în condiţii naturale, bacteriile trebuie să aibă o proprietate suplimentară, atribut al virulenţei, şi anume *comunicabilitatea* (contagiozitatea) sau *infecţiozitatea*, reprezentată de capacitatea lor de a-şi stabili o localizare şi de a forma un focar primar de infecţie, atunci cînd ajung pe suprafaţa corpului-gazdei sau în interiorul lui.

Complexitatea factorilor componenţi ai virulenţei bacteriene este bine ilustrată de manifestările naturale ale infecţiei streptococice la om: unele tulpini de streptococ hemolitic de grup *A* pot avea o mare putere de invazie şi produc *bacteriemii;* altele sînt foarte toxigene, produc o toxină eritrogenă, şi dau scarlatine grave; altele elaborează substanţe care produc febră etc. Astfel de tulpini foarte patogene pot avea uneori o infecţiozitate mică sau, invers, tulpini cu infecţiozitate mare pot produce o îmbolnăvire foarte atenuată. Toţi aceşti factori (toxigeneza, puterea de invazie, infecţiozitate ş.a.) variază independent unul de altul şi, de aceea, pentru ca să producă epidemii grave, o tulpină trebuie să posede mai multe sau chiar toate proprietăţile care condiţionează virulenţa.

Virulenţa bacteriilor, considerată sub raportul infecţiozităţii sau al toxicităţii lor, se aprecia iniţial în funcţie de cantităţile minime de bacterii sau de toxină capabile să producă moartea animalelor la care erau administrate. Ea se exprima prin *doza limită mortală* (DLM), care este cantitatea minimă de bacterii (sau de toxină) care produce infecţia (respectiv intoxicaţia) şi moartea unui animal receptiv, raportată la o anumită specie animală cu o greutate standard şi la o anumită perioadă de timp.

Pentru a preîntîmpina erorile legate de rezistenţa individuală variabilă, determinările se fac pe loturi mai mari de animale şi se exprimă convenţional

prin DL_{50}, care reprezintă cantitatea minimă de germeni (sau de toxină) care determină moartea a 50% din animale inoculate.

Prin caracterizarea virulenţei unei tulpini bacteriene, se mai au în vedere durata perioadei de incubaţie, durata şi gravitatea bolii etc.

Ulterior, pentru cazurile în care moartea animalului nu poate fi folosită drept criteriu al virulenţei, s-au luat în considerare alte efecte patologice care pot fi corelate cu doza de bacterii necesară pentru a determina apariţia lor la 50% din animalele inoculate: de exemplu, virulenţa poate fi exprimată şi prin *doza infecţioasă*$_{50}$ (ID_{50}), care reprezintă cantitatea de bacterii necesară pentru a produce infecţia.

Virulenţa microorganismelor este variabilă, atît în condiţii naturale, cît şi în condiţii de laborator, ea putînd fi pierdută, spre exemplu, în urma unei mutaţii. În multe cazuri, virulenţa sau avirulenţa sînt proprietăţi biologice corelate cu anumite caractere de structură, de compoziţie chimică sau de cultură ale bacteriilor respective. Astfel, faptul că posedă capsulă conferă bacteriilor patogene o virulenţă superioară, graţie unei rezistenţe mai mari faţă de fagocitoză, comparativ cu aceea a celulelor necapsulate. Prezenţa capsulei nu este însă sinonimă cu virulenţa, care implică existenţa mai multor atribute, dintre care capacitatea de a elabora capsulă este numai unul. De altfel, formarea unei capsule trebuie interpretată mai curînd ca un mecanism de apărare a bacteriei decît ca un indiciu al agresivităţii ei, deoarece polizaharidele capsulare nu sînt dăunătoare nici pentru leucocit şi nici pentru alte ţesuturi.

Virulenţa este de asemenea variabilă după natura coloniei („R" sau „S") cu care se face infecţia. În general, bacteriile izolate din produsele patologice ce au virulenţa mare şi formează colonii „S" (cu excepţia lui *B. anthracis* şi a altor cîteva specii, ca *C. diphteriae* şi unele tulpini de *Mycobacterium*).

II. MODIFICĂRILE PRODUSE DE AGENŢII PATOGENI ÎN ORGANISM

1. INFECŢIA ŞI BOALA

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organismul uman sau animal ca urmare a pătrunderii şi multiplicării în el a unor agenţi patogeni (virusuri, bacterii, ciuperci microscopice).

Pentru producerea unui proces infecţios este necesar ca agentul patogen să pătrundă într-un organism în doză suficientă şi pe o cale potrivită şi, în plus, organismul să fie receptiv, adică să permită multiplicarea agentului patogen şi elaborarea de toxine.

După concepţiile moderne, procesul infecţios trebuie interpretat ca rezultatul interacţiunii dintre micro- şi macroorganism, interacţiune în care rolul relativ al celor doi factori variază după natura infecţiei, astfel încît procesul infecţios reprezintă o reacţie a macroorganismului la acţiunea excitantului patologic complex, care este agentul patogen. În spiritul acestei concepţii, agentul patogen este forţa de acţiune a procesului infecţios, iar reactivitatea

organismului stabileşte intensitatea, extinderea, gravitatea şi chiar posibilitatea apariţiei procesului infecţios. Reactivitatea organismului este coordonată de sistemul nervos central al gazdei. La rîndul lor, reactivitatea gazdei şi agentul patogen se află sub influenţa factorilor de mediu, care imprimă astfel indirect unele modificări procesului infecţios

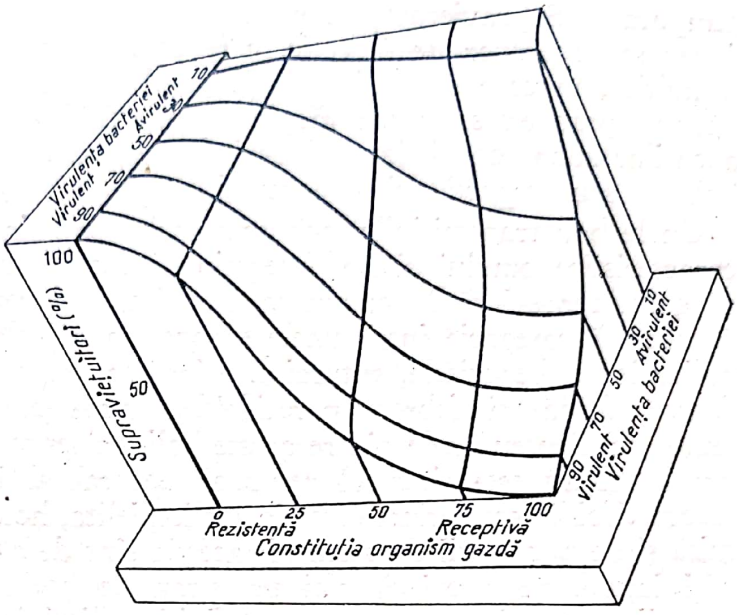


Fig. 371. Model reprezentînd interacţiunea dintre genotipul gazdei (variind de la receptiv la rezistent) şi acela al microorganismului patogen (variind de la avirulent la virulent). Gravitatea bolii este reprezentată de înălţimea modelului în raport cu baza şi este apreciată în funcţie de procentul supravieţuitorilor după trecerea prin boală (după Gowen).

Specificitatea procesului infecţios se manifestă prin aceea că fiecare boală infecţioasă este produsă de un anumit agent patogen. Această noţiune fundamentală a fost stabilită de Pasteur cu ocazia studiilor sale asupra fermentaţiilor şi asupra bolii viermilor de mătase *(pebrina)*.

În 1878, în urma cercetărilor sale asupra infecţiei cărbunoase, Koch stabileşte criteriile necesare pentru a demonstra că un anumit microorganism este cauza unei anumite boli (postulatele lui Koch): *1)* agentul patogen să fie prezent în organismul bolnav, în toate cazurile, în leziunile caracteristice bolii; *2)* microorganismul respectiv să poată fi izolat şi cultivat în afara organismului în culturi pure, cu subculturi în serie; *3)* introducerea microorganismului izolat la un organism sănătos (animal de experienţă sensibil) să reproducă boala caracteristică, iar agentul patogen să poată fi din nou izolat de la acesta, cu aceleaşi caractere.

Cu toate că exigenţele acestor postulate nu pot fi îndeplinite în toate cazurile de boli infecţioase, ele reprezintă şi astăzi îndreptarul pentru a stabili legătura cauzală dintre un agent patogen şi o anumită boală infecţioasă. În plus, dezvoltarea cunoştinţelor a permis adăugarea unor criterii noi: apariţia unor reacţii serologice pozitive de diagnostic, datorite anticorpilor specifici care apar în cursul bolii, şi instalarea unor stări de imunitate, în sensul că animalele care au fost infectate experimental rezistă la inocularea cu acelaşi agent patogen.

2. CONDIŢIILE DE APARIŢIE A BOLILOR INFECŢIOASE

1) *Izvorul de infecţie.* Mediul extern (aerul, apa, solul etc.) reprezintă un mediu străin pentru microbii patogeni sau entităţile infecţioase virale care nu găsesc în el condiţii de multiplicare, ci cel mult condiţii de supravieţuire

temporară. Supravieţuirea lor în natură este determinată de existenţa unui *izvor* sau *rezervor de infecţie,* care serveşte drept loc natural de trai şi de înmulţire, în care se realizează procesul de acumulare naturală şi de la care agentul patogen se poate răspîndi, infectînd alţi indivizi sănătoşi. În cazul agenţilor zoopatogeni, izvorul de infecţie este reprezentat de omul şi animalele bolnave sau de purtători de germeni.

Unele boli transmisibile, cunoscute sub denumirea de *antroponoze,* sînt strict caracteristice omului şi nu determină infecţii naturale ale altor specii, astfel că omul reprezintă în asemenea cazuri unicul rezervor de infecţie în natură. În această categorie intră unele viroze, ca rujeola, variola, varicela, oreionul, poliomielita, hepatitele, guturaiul, gripa etc., precum şi bacterioze ca dizenteria, febra tifoidă şi febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra etc. Pentru unele dintre aceste boli, ca lepra, sifilisul, variola, rujeola etc., omul bolnav este singurul rezervor natural al infecţiei. În alte cazuri însă (febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomielita, holera etc.) boala poate fi transmisă şi de purtătorii de germeni; aceştia sînt de obicei foşti bolnavi care, deveniţi imuni, nu prezintă nici un semn de boală dar păstrează în organism agenţii patogeni, temporar sau definitiv, eliminîndu-i în mediu.

Purtătorii de germeni au o deosebită importanţă pentru răspîndirea agenţilor patogeni în natură, deoarece, fiind aparent sănătoşi, ei sînt greu de depistat şi astfel se pot deplasa nestînjeniţi în colectivităţi unde pot transmite boala la organisme receptive.

O altă categorie de boli transmisibile, cunoscute sub denumirea generică de *antropozoonoze* sau *zoonoze,* sînt comune omului şi animalelor. Izvorul lor de infecţie este reprezentat de diferite animale domestice sau sălbatice. Astfel, rezervor de infecţie pot fi cîinele pentru rabie (turbare), febră butonoasă sau leptospiroze, bovinele pentru salmoneloze, vaccină, bruceloze, tuberculoză, febră Q etc., şobolanii pentru salmoneloze, leptospiroze, febra muşcăturii de şobolan (sodoku), turbare, pestă (ciumă), tifos murin etc., iar păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

2) *Căile de eliminare a agenţilor patogeni.* Simpla existenţă a unui izvor de infecţie nu este suficientă pentru răspîndirea bolii infecţioase, ci este necesar ca din organismul care constituie acest izvor, agenţii patogeni să fie eliminaţi pentru a deveni apţi să infecteze noi gazde. Calea de eliminare este determinată în general de *localizarea* lor specifică în organismul gazdei animale:

Calea intestinală serveşte la eliminarea germenilor enterotropi prin intermediul materiilor fecale care pot conţine, intermitent sau continuu, cantităţi mari de agenţi patogeni microbieni ca aceia ai febrelor tifoide şi paratifoide, dizenteriei, holerei şi toxiinfecţiilor alimentare, precum şi virusuri ca acelea ale hepatitei epidemice şi poliomielitei.

Calea respiratorie asigură răspîndirea agenţiilor patogeni ai infecţiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, gripa, variola, varicela, oreionul, guturaiul etc.) prin intermediul secreţiilor nazofaringiene şi bucale, proiectate mai ales atunci cînd omul vorbeşte, tuşeşte sau strănută. Pe această cale, omul

bolnav sau purtător de germeni răspîndeşte în jur o pulbere fină de aerosoli constituiţi din picături microscopice de secreţii încărcate cu microorganisme.

În afară de aceste căi principale, agenţii patogeni se mai pot elimina prin *leziuni deschise* — răni şi supuraţii (în cazul infecţiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, tetanos, gangrena gazoasă etc.) — pe *cale urinară* (în febra tifoidă, leptospiroze, febra Q, tuberculoză renală), prin *secreţia glandei mamare* (în bruceloză, tuberculoză, febră Q etc.).

În cazul unor infecţii generalizate, care nu au o poartă de ieşire naturală din organism, eliminarea agentului patogen se face pe *cale mecanică,* în mod natural prin intervenţia unui artropod hematofag, care suge sîngele infectat (în paludism, tifos exantematic, pestă, encefalite virale), sau în mod accidental prin seringă sau instrumente chirurgicale (hepatită, sifilis).

3) *Căile de transmitere a agenţilor patogeni.* A treia condiţie pentru apariţia unei boli transmisibile este ca, după eliminarea agenţilor patogeni din rezervorul natural, să existe posibilitatea transmiterii lor la o gazdă nouă, receptivă. Aceasta se realizează prin *contact direct,* atunci cînd între organismul donator de germeni şi cel receptor există o legătură strînsă, fără participarea vreunui factor de mediu. Astfel se întîmplă în infecţiile transmise prin muşcătură (turbarea, febra sodoku, unele infecţii cu anaerobi), prin supt (la animale febra Q şi tuberculoza, la om infecţii cu piogeni), prin sărut (tuberculoză pulmonară, sifilis etc.), prin contact cutanat direct în boli de piele (dermatomicoze) sau venerice (sifilis, gonoree etc.). Cel mai frecvent însă transmiterea se face pe o *cale indirectă,* prin interpunerea mai mult sau mai puţin evidentă a unui factor de mediu neanimat *(vehicul)* sau a unui organism viu *(vector)* între izvorul de infecţie şi individul receptiv.

Transmiterea prin intermediul aerului se face prin inhalarea picăturilor septice răspîndite de un bolnav sau de un purtător de germeni. Cele mai periculoase sînt picăturile foarte mici *(nucleii),* care conţin germeni şi care pot rămîne în suspensie în aer mult timp după eliminarea lor din organism.

Transmiterea hidrică (prin intermediul apei) este proprie infecţiilor intestinale (febrele tifoide şi paratifoide, holeră, hepatite, enteroviroze), precum şi leptospirozelor şi se realizează prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenţi patogeni proveniţi de obicei din dejecţii umane sau animale.

Transmiterea prin alimente (lapte, carne, ouă etc.) se produce în cazul cînd acestea provin de la animale infectate sau sînt contaminate prin manipularea lor de o persoană (bolnav sau purtător) eliminatoare de agenţi patogeni. De obicei, bacteriile patogene au posibilitatea să se multiplice în prealabil în alimentele respective care reprezintă adevărate medii de cultură. Prin intermediul alimentelor pot fi transmise boli ca febra tifoidă, toxiinfecţiile alimentare cu stafilococi şi salmonele, febra Q, cărbunele intestinal, botulismul etc.

Transmiterea prin intermediul solului se realizează de obicei la nivelul unor plăgi poluate cu pămînt şi este întîlnită în special în cazul unor bacterii sporulate ca *B. anthracis* (agentul patogen al cărbunelui sau dalacului), *Cl. tetani* (care determină tetanosul), *Welchia perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum* (agenţii patogeni ai gangrenei gazoase).

Transmiterea prin intermediul obiectelor folosite de un bolnav (veselă, rufărie, îmbrăcăminte, jucării, cărţi şi caiete etc.) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporţional cu rezistenţa agenţilor patogeni la condiţiile de mediu; ea este întîlnită în cazul tuberculozei, difteriei, variolei, scarlatinei etc.

Transmiterea prin vectori se realizează prin intermediul *artropodelor,* de cele mai multe ori hematofage (insecte, căpuşe), care iau agenţii patogeni din izvorul natural şi îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înţepături, fie depunîndu-i pe tegumentele normale sau lezate. Vectorul poate fi el însuşi infectat (transmisiune biologică) sau acţionează numai ca simplu purtător mecanic (pasiv) de agenţi patogeni în tubul digestiv ori pe suprafaţa externă a corpului ca, de exemplu, musca pentru agenţii patogeni ai febrei tifoide, dizenteriei etc. În cazul transmiterii biologice, o dată ajunşi în organismul vectorului, unii agenţi patogeni trec numai printr-un simplu proces de multiplicare masivă (ca, de exemplu, *Rickettsia prowazeki,* agentul tifosului exantematic, în corpul păduchelui), în timp ce alţii se multiplică şi în acelaşi timp parcurg o fază a ciclului lor de evoluţie (de exemplu, sporozoarul *Plasmodium* sp., agentul patogen al malariei, în organismul ţînţarului).

4) *Poarta de intrare în organism.* Pentru ca agenţii patogeni să provoace o boală infecţioasă este necesar ca ei să învingă *barierele naturale* care se opun pătrunderii lor în organismul unei gazde noi. *Poarta de intrare* în organism corespunde în general căii prin care s-a făcut eliminarea agentului patogen, fiind însă determinată şi de modul de transmitere.

De cele mai multe ori, poarta de intrare a germenilor în organism este reprezentată de: *1) căile respiratorii,* în boli ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina etc.; *2) calea digestivă* (gura, intestinul, în febra tifoidă, dizenterie, holeră, toxiinfecţii alimentare, bruceloze, botulism, tuberculoza intestinală, febra Q, hepatite infecţioase, poliomielită etc.); *3) calea cutanată* (cărbune, tularemie, febră Q, bolile transmise prin muşcătură, rănire şi prin înţepătura vectorilor etc.). Anumiţi agenţi patogeni străbat chiar prin pielea intactă, dar de obicei pătrunderea lor este condiţionată de existenţa unor leziuni infime, zgîrieturi, înţepături de insectă, înţepături de ac de seringă, răni deschise etc.

Unii agenţi patogeni pot avea mai multe căi de pătrundere în organism, dintre care una este, de obicei, cea principală, dar determină aceleaşi manifestări clinice, indiferent de natura porţii de intrare. Alţii produc însă boli cu caractere clinice diferite, în funcţie de poarta de intrare, ca unic factor determinant, şi fără relaţie cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. Astfel, infecţia cu *Bacillus anthracis* determină cărbunele cutanat (pustula malignă) după infectarea prin piele, cărbunele intestinal după ingestia de alimente contaminate şi infecţii pulmonare grave după pătrunderea microbului pe cale respiratorie.

În funcţie de *perioada de viaţă în care se produce infectarea* organismelor animale, se poate vorbi de patru tipuri de infecţie.

a) *Infecţia germinală* este întîlnită în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sînt purtătorii agentului infecţios pe care-l transmit celulei-ou, o dată

cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecţie, nedemonstrat la om şi la animalele superioare, a fost descris la unele artropode, de exemplu la căpuşa din genurile *Ornithodorus*, *Dermacentor* şi *Rhipicephalus*, infectată în acest mod cu bacteria spiralată *Borrelia recurrentis*, agentul patogen al febrei recurente de căpuşe, sau cu alţi agenţi patogeni.

b) *Infecţia transplacentară* (intrauterină) este posibilă şi la om. În unele cazuri, ea este condiţionată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acţiunea agentului patogen (de exemplu, cele produse de *Treponema pallidum* în sifilis, *Brucella* sp. în bruceloze sau *Coxiella burnetii* în febra Q), în timp ce în alte cazuri infecţia se face fără modificări placentare (de exemplu, în variolă, rujeolă etc.).

c) *Infecţia intra-partum* este produsă, de obicei, de microorganisme patogene prezente în căile genitale ale mamei, care infectează fătul în momentul în care el traversează căile genitale în timpul naşterii (de exemplu, agentul oftalmiei sau conjunctivitei gonococice a noilor născuţi).

d) *Infecţiile post-partum*, care reprezintă marea majoritate a infecţiilor observate la om şi la animale, se produc după naştere, începînd mai ales de la vîrsta de cîteva luni, o dată cu epuizarea imunităţii pasive conferite prin transferul transplacentar al anticorpilor materni.

3. EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS

Fiecare proces infecţios se exteriorizează printr-o serie de manifestări caracteristice care-i sînt proprii, determinate de modificările specifice pe care le produce fiecare agent patogen în organismul-gazdă, ca rezultat al afectării unor categorii diferite de celule diferenţiate. Făcînd abstracţie de aceste caractere particulare fiecărei infecţii în parte, există cîteva trăsături generale întîlnite în oricare proces infecţios.

După pătrunderea lor în organismul uman sau animal, unii agenţi patogeni rămîn de obicei localizaţi la poarta de intrare în cursul întregii evoluţii a infecţiei, în timp ce produsele lor toxice se pot răspîndi în tot organismul gazdei pe cale sangvină (toxina difterică) sau nervoasă (toxina tetanică). Alteori însă, după o perioadă iniţială de multiplicare locală, ei se răspîndesc în organism în diferite moduri:

1) *Diseminarea prin continuitate* se realizează cel mai frecvent prin extinderea infecţiei din aproape în aproape, într-un sistem canalicular preexistent (bronhii, căile biliare, căile urogenitale etc.), în care agentul patogen întîlneşte doar o rezistenţă mică, legată de scurgerea secreţiilor respective şi de unele manifestări de motilitate locală îndreptate în sens contrar progresiunii sale. Dacă difuziunea se face în ţesuturi, bacteriile trebuie să învingă rezistenţa reprezentată de substanţa intracelulară (de exemplu, substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv) la care, în cazul infecţiilor intracelulare, se adaugă şi rezistenţa opusă de membrana celulară.

2) *Diseminarea prin continuitate* se întîlneşte în cazul agenţilor infecţioşi cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii), care odată liberaţi prin necro-

zarea celulei sau ruperea membranei celulare, pătrund şi se fixează în celulele sensibile înconjurătoare.

3) *Diseminarea pe cale limfatică*, cea mai frecventă, este iniţiată de reacţia inflamatorie a vaselor limfatice, la început a celor regionale, însoţită de reacţia ganglionilor limfatici corespunzători (adenopatie). După depăşirea acestei bariere, agentul infecţios poate trece în canalul toracic şi de acolo în sînge.

4) *Diseminarea hematogenă*, pe calea capilarelor şi a altor vase sanguine, poate începe chiar din apropierea porţii de intrare în cazul cînd procesul infecţios este însoţit de leziuni ale pereţilor vasculari sau, de cele mai multe ori, este consecutivă unei diseminări iniţiale pe cale limfatică. În aceste cazuri, agentul patogen prezent în sîngele circulant (bacteriemie) este răspîndit în tot organismul, putîndu-se localiza în diferite organe sau ţesuturi.

Perioada iniţială a infecţiei, numită perioada de *incubaţie*, reprezentată de timpul scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism şi acela al debutului bolii, nu se exteriorizează prin nici un simptom clinic evident. Durata ei variază între anumite limite, în funcţie de natura agentului patogen şi, pentru aceeaşi infecţie, în relaţie cu doza infectantă, virulenţa agentului patogen şi reactivitatea organismului-gazdă. Contrar aparenţelor, incubaţia reprezintă o perioadă de activitate a agentului patogen care în cursul ei se multiplică, se localizează la nivelul ţesutului receptiv şi elaborează substanţe toxice.

Organotropismul variat al agenţilor patogeni este legat de faptul că fiecare dintre ei îşi găseşte, în anumite ţesuturi sau organe, condiţiile cele mai favorabile de dezvoltare. Astfel, indiferent de calea de introducere în organism, vibrionul holeric se localizează în intestin, bacilul dizenteric în peretele intestinului gros ş.a.m.d. Din aceste focare bacteriile pot trece din nou în sînge, provocînd infecţii generalizate cu bacteriemie. În mod obişnuit, bacteriile nu se înmulţesc în sîngele circulant. De aceea, prezenţa lor în acest ţesut indică de obicei o revărsare de corpi microbieni din focarele extravasculare, revărsare atît de abundentă încît depăşeşte capacitatea de distrugere proprie mecanismelor de protecţie ale gazdei.

În momentul în care numărul de germeni şi cantitatea de toxine acumulate au ajuns la un anumit nivel se produce *debutul bolii*, care poate fi brusc sau lent şi care marchează începutul unei perioade, mai mult sau mai puţin îndelungate, în care apar diferitele semne de boală — *perioada de invazie*. Urmează o fază, de durată de asemenea variabilă, în care simptomele se manifestă cu o intensitate maximă — *perioada de stare* — la sfîrşitul căreia simptomele dispar brusc (în *crisis*) sau lent (în *lysis*). Perioada următoare este aceea de *convalescenţă*, în care organismul îşi reface potenţialul de activitate anterior bolii şi care se însoţeşte, de cele mai multe ori, de o *stare de imunitate*, mai mult sau mai puţin solidă.

În unele cazuri, evoluţia unui proces infecţios nu se exteriorizează printr-o simptomatologie clinică evidentă, ci el decurge asimptomatic, sub formă de *infecţie inaparentă*, fără să producă o stare de boală. Un exemplu tipic în acest sens îl oferă tuberouloza. Infecţia tuberculoasă inaparentă, depistată

numai cu ajutorul reacţiei la tuberculină, este foarte frecventă, în timp ce tuberculoza ca boală clinică evidentă este relativ rară, fiind întîlnită numai la o mică parte dintre persoanele care reacţionează pozitiv la tuberculină.

4. INFECŢIA LA NEVERTEBRATE ŞI LA VERTEBRATELE INFERIOARE

Infecţia este un *proces patologic* întîlnit în toate clasele de animale, de la cele inferioare pînă la mamifere şi om.

În general, la animalele lipsite de sisteme de termoreglare şi homeostazie sau înzestrate numai cu mecanisme imperfecte de realizare a acestor funcţii, infecţiile produc boli care au tendinţa de a se generaliza, din cauza lipsei unei reacţii inflamatorii locale, de a fi influenţate ca evoluţie de temperatura mediului extern şi de a fi produse chiar de unele microorganisme comensale intestinale, ectoparazite sau saprofite din mediul extern. Bolile cele mai cunoscute ale insectelor (bolile larvelor de albine şi ale viermilor de mătase) au de obicei caracter generalizat, cu bacteriemie, şi sînt produse de cocobacili Gram-negativi. Infecţiile vertebratelor cu sînge rece sînt de asemenea generalizate şi produse de o microfloră foarte polimorfă. Deosebit de importante din punct de vedere economic sînt bacteriozele peştelor. De exemplu, furunculoza produsă de *Bacterium salmonicida* determină o bacteriemie însoţită de lichefierea rinichiului şi de apariţia unor leziuni de tipul furunculelor pe suprafaţa muşchilor.

Particularităţile de evoluţie ale infecţiei şi imunităţii la nevertebrate au făcut obiectul unor cercetări importante ca acelea ale lui I. I. Metchnikoff (la amibă), I. Cantacuzino (la *Sipunculus nudus*) şi S. I. Metalnikov (la *Galleria melonella*).

ELEMENTE DE IMUNOLOGIE

Imunologia este ştiinţa care se ocupă cu studiul reactivităţii organismelor în cursul infecţiei şi al imunităţii, analizînd diferitele proprietăţi şi funcţii ale acelor celule, ţesuturi şi umori care condiţionează prezenţa şi evoluţia proceselor infecţioase şi imunitare.

Prin imunitate se înţelege starea de nereceptivitate sau de *rezistenţă* a unui organism faţă de infecţia cu un anumit agent patogen. Ea se manifestă la om, la animale şi la plante prin aceea că agentul patogen pătruns în organism este pus de acesta în imposibilitate de a produce boala. Noţiunea de imunitate este, prin urmare, opusă aceleia de infecţie. Termenul de imunitate, folosit în sens larg pentru această stare de „lipsă de boală", îşi are originea în cuvîntul latin *immunus*, care înseamnă „scutit de orice obligaţii" sau „scutit de impozite".

1. MECANISMELE DE BAZĂ ALE IMUNITĂŢII

Organismele animale, în special cele superioare, sînt protejate împotriva diferitelor agresiuni microbiene prin mai multe mijloace de apărare. În primul rînd, piele şi mucoasele, prin structura, integritatea anatomică şi secreţiile lor, reprezintă o barieră pentru cele mai multe microorganisme. În cazul în care aceste bariere sînt depăşite, celulele unor ţesuturi şi organe (ganglioni limfatici, splină, ficat) acţionează ca „filtre" care captează şi imobilizează microorganismele, ca pe orice particule străine, împiedicînd răspîndirea lor în organism, iar anumite substanţe din lichidele organismului normal (sînge, limfă) se comportă ca factori antimicrobieni.

Cel mai important mijloc de apărare antiinfecţioasă este însă *reacţia de imunitate* prin care organismul reuşeşte să oprească invazia agenţilor patogeni, să le împiedice multiplicarea şi să-i distrugă, dobîndind totodată proprietatea de a răspunde mai rapid şi mai intens faţă de un contact ulterior cu acelaşi agent patogen. Activitatea sistemelor imune din organismul uman şi animal se bazează pe proprietatea biologică fundamentală de „recunoaştere" a substanţelor care sînt proprii *(self)* organismelor respective de cele care îi sînt străine *(non self)* (Burnet şi Fenner, 1949). Pe această proprietate se bazează selectivitatea reacţiilor imune care se traduce prin aceea că oragnismul cu o

reactivitate normală nu răspunde imunologic faţă de constituenţii săi proprii *(self)* deci „imunologic acceptabili", dar reacţionează intens la sistemul pe care-l constituie prezenţa în intimitatea structurii sale a ceea ce îi este străin, adică *non self*, deci „imunologic inacceptabil".

2. FACTORII CELULARI AI IMUNITĂŢII. FAGOCITOZA

Factorul cel mai important care determină reacţia de apărare a organismului uman sau animal faţă de agresiunile microbiene este reprezentat de intrarea în acţiune a unui număr însemnat de celule diferite, care îndeplinesc funcţiile de a capta particulele şi macromoleculele străine *fagocitoză* şi *pinocitoză)* şi de a le degrada prin digestia intracelulară, de a izola aglomerările de bacterii printr-un perete de ţesut conjunctiv *(incapsulare)*, de a contribui la diferite procese reparatorii şi de cicatrizare şi de a produce substanţe specifice antimicrobiene numite *anticorpi*. Aceste celule aparţin aproape exclusiv ţesutului conjunctiv subcutan şi interstiţial al diferitelor organe (inclusiv creierul), sîngelui, limfei şi ţesutului reticular. Activitatea celulelor cu rol imunitar este deosebit de importantă, deoarece ele sînt răspîndite practic în tot organismul şi sînt uşor de mobilizat, iar foarte multe dintre ele au acţiune fagocitară şi elaborează enzime digestive puternice. În acelaşi timp, unele dintre ele (limfocitul, hemocitoblastul şi unele macrofage tisulare) păstrează în diferite grade capacitatea embrionară de a se transforma în alte celule, constituind la organismele adulte o rezervă mezenchimală potenţială.

Fagocitoza a fost descoperită în anul 1882 de Ilia Ilici Metchnikoff care a dat numele generic de fagocit („celulă care mănîncă") celulelor libere sau fixe care au capacitatea de a îngloba în citoplasma lor particulele fine cu care vin în contact şi de a le distruge printr-un proces de digestie intracelulară ori de cîte ori natura chimică a acestora le face accesibile enzimelor fagocitului.

Funcţiile generale ale fagocitelor. După cum a arătat Metchnikoff, fenomenul de fagocitoză este foarte răspîndit pe scara animală, ingestia şi digestia intracelulară avînd o semnificaţie fiziologică multiplă, dependentă de complexitatea organismului. Astfel, dacă la om şi la animalele superioare fagocitoza asigură, printre altele, captarea şi distrugerea agenţilor patogeni pătrunşi în organism la protozoare şi la metazoarele primitive (celenterate şi spongieri), ea reprezintă mecanismul lor de nutriţie constînd din înglobarea şi digestia particulelor, urmată de eliminarea părţilor nedigerabile. În afară de aceasta, fagocitele sînt implicate în metamorfoza nevertebratelor şi a vertebratelor inferioare, realizînd resorbţia celulelor distruse. În sfîrşit, la organismele superioare, fagocitele joacă şi rolul de „măturător" prin aceea că înglobează şi digeră celulele devenite inutile, pe cele cu viaţă scurtă şi pe cele care au murit sub acţiunea unui agent patogen, contribuind astfel la eliminarea unor resturi organice nefolositoare ori nocive sau reintroducînd în economia generală a organismului unii dintre constituenţii lor chimici

a. Anatomia şi fiziologia sistemului fagocitar

Sistemul fagocitar reprezintă un ansamblu morfo-funcţional compus din celule de origine mezodermică, deosebite ca morfologie şi ca localizare în organism, dar avînd în comun proprietatea de a îngloba particulele fine cu care vin în contact şi de a le distruge printr-un proces de digestie intracelulară, în măsura în care materialul ingerat poate constitui un substrat propice pentru activitatea enzimelor fagocitare (tabelul 26). După natura lor, celulele cu proprietăţi fagocitare pot fi împărţite în două categorii: *1) fagocite polimorfonucleare*, prezente în sînge, măduva osoasă şi ţesuturi, subîmpărţite în două tipuri — *neutrofile* şi *eozinofile* — după proprietăţile tinctoriale ale granulelor lor citoplasmatice; *2) fagocite mononucleare*, reprezentate de monocitele din sînge şi macrofagele din ţesuturi şi organe ca măduvă osoasă, splină, ganglionii limfatici şi ficat.

Polimorfonuclearele neutrofile sînt celule orginare din măduva osoasă, unde ajung la maturitate aproximativ în trei zile, după care sînt transportate de sînge pînă la locul lor de funcţionare, în ţesuturi. Pentru fiecare neutrofil circulant există o rezervă de circa 100 de celule mature în măduva osoasă. Producerea şi maturarea în măduvă, liberarea din măduvă în sînge şi migrarea lor din sînge în ţesuturi constituie etapele perfect reglate ale unui proces continuu. Neutrofilele sînt celule terminale din punctul de vedere al citogenezei şi, ca atare, sînt incapabile de diviziune şi au o durată de viaţă scurtă (cîteva zile). Ele rămîn în sînge 6—12 ore, după care părăsesc definitiv circulaţia, traversînd pereţii capilarelor, trecînd în ţesuturi unde după un timp mor sau sînt eliminate în lumenul căilor respiratorii sau al intestinului.

Neutrofilele sînt celule mobile, capabile de locomoţie prin emiterea de *pseudopode*. Sensul deplasării poate fi orientat datorită proprietăţii lor de chimiotactism. Ele sînt capabile de *fagocitoză* (încorporarea de particule) şi *pinocitoză* (înglobarea de substanţe macromoleculare solvite). Granulele lor neurofile

TABELUL 26

NUMĂRUL ABSOLUT ŞI FRECVENŢA RELATIVĂ NORMALĂ A DIFERITELOR TIPURI DE LEUCOCITE LA OM

Tipul celulei	%	Numărul absolut/mm³
Toate tipurile	100	5 000—10 000
Neutrofile nesegmentate	3—5	150—400
Neutrofile segmentate	54—62	3 000—5 800
Eozinofile	1—3	50—250
Bazofile	0—0,75	15—50
Limfocite	25—33	1 500—3 000
Monocite	3—7	285—500

Scanned with OKEN Scanner

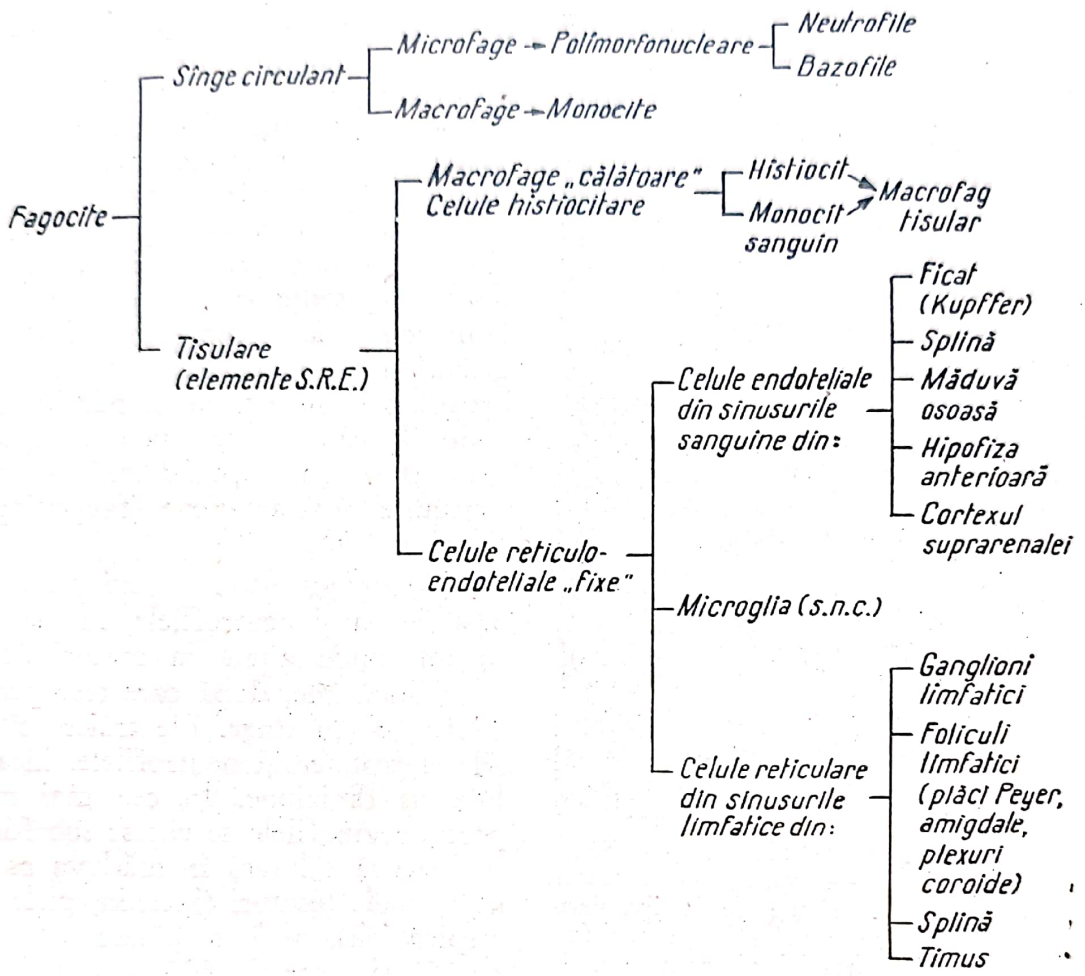


Fig. 372. Clasificarea principalelor tipuri de celule cu proprietăţi fagocitare.

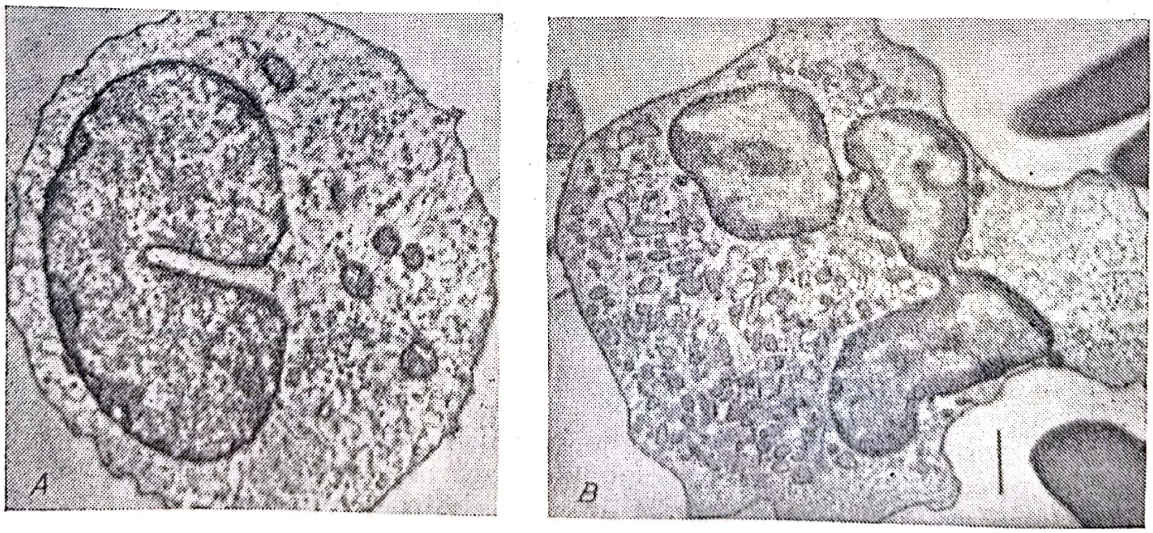


Fig. 373. Leucocite neutrofile: în repaus, cu nucleu caracteristic „în potcoavă" *(A)* şi emiţînd pseudopode *(B)* (microelectronografie după Boccearelli).

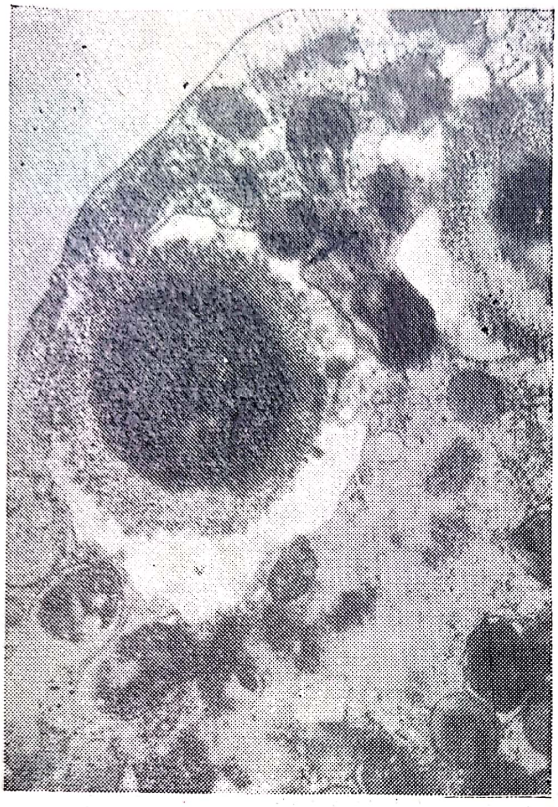


Fig. 374. Particulă de zimozan — perete celular de levură *(z)* — ingerată de un leucocit neutrofil după 1½ minute de la inoculare. Se observă două granulații *(G)* care au fost fixate în cursul procesului de pătrundere în vacuola fagocitară. După cum arată săgețile, membranele lor au fuzionat cu membrana delimitată a vacuolei *(V)* (după Zucker-Franklin).

(50—200 pe celulă) reprezintă structuri dense, omogene, rotunde sau baciliforme, deseori delimitate de o membrană, care conțin sau de care sînt legate solid, numeroase enzime hidrolitice, ca proteinaze, lipaze, RN-aze și DN-aze, fosfataze, peroxidaze și lizozim, enzime care asigură degradarea substanțelor străine înglobate. Din punct de vedere fizic și chimic granulațiile neutrofile sînt similare organitelor citoplasmatice numite lizozomi de care se deosebesc în special prin prezența suplimentară a unor substanțe antibacteriene (fagocitină și lizozim).

Polimorfonuclearele eozinofile iau naștere, ca și neutrofilele, în măduva osoasă, unde ajung la maturitate în circa două zile, după care trec pentru cîteva ore în sînge. Ele trăiesc cîteva zile și sînt, ca și neutrofilele, incapabile de diviziune. În cea mai mare parte, eozinofilele se găsesc sub formă de rezervă celulară în măduva osoasă și în unele țesuturi (intestin, piele, căi respiratorii), unde se găsesc în număr de 200 și respectiv 500 de celule pentru fiecare eozinofil circulant. Fiziologia eozinofilelor este similară aceleia a neutrofilelor. Particularitatea lor constă în aceea că sînt în mod special apte să înglobeze particule acoperite cu anticorpi care, în acest caz, au, după cîte se pare, rolul de a favoriza fagocitoza formațiunilor particulate inaccesibile neutrofilelor și macrofagelor. Eozinofilele participă în mod direct și la procesul de anticorpogeneză, asigurînd probabil transportul precoce al antigenelor, la nivelul celulelor formatoare de anticorpi. Polimorfonuclearele de acest tip au un rol homeostatic important, protejînd organismul de efectele dăunătoare ale acumulării complexelor antigen-anticorp prin aceea că înglobează și degradează aceste complexe.

Importanța leucocitelor, în special neutrofile, în reacțiile de apărare este demonstrată și de faptul că lipsa ori scăderea patologică a numărului lor (de exemplu, în boala numită agranulocitoză) sau alterarea lor prin agenți fizici (radiații) ori chimici măresc mult sensibilitatea organismului la infecții.

Fagocitele mononucleare sînt prezente atît în sîngele circulant, *monocitul* sau *marele mononuclear*, cît și în țesuturi unde se găsesc sub formă de celule fie

fixe, fie „călătoare". Mononuclearele tisulare „călătoare", reprezentate printr-un grup mare şi eterogen de celule denumite generic *macrofage* sînt prezente aproape în tot organismul, dar se concentrează de obicei în anumite organe, adeseori în contact cu vasele lor limfatice sau sanguine. Denumirea de macrofag, bazată după Taliafero pe criterii funcţionale şi nu morfologice, poate fi atribuită oricărei celule de tipul mononuclearului mare care nu este intens bazofilă şi care devine fagocitară fără schimbări morfologice esenţiale. Considerate ca o unitate fiziologică, macrofagele alcătuiesc *sistemul reticulo-endotelial* (SRE), ale cărui elemente sînt prezente în special în ficat (celulele stelate ale lui Kuppfer, care limitează sinusoidele şi sînt în contact direct cu circuitul sanguin), în splină (macrofagele din pulpa roşie şi celulele „litorale" din sinusoide), în ganglionii limfatici (celulele reticulare), în suprarenale şi în hipofiza anterioară, în pulmoni (celula septală), în ţesutul conjunctiv lax etc.

În afară de celulele fagocitare, în reacţia de apărare antimicrobiană mai participă şi unele celule lipsite de proprietăţi fagocitare cum este *fibroblastul*, din ţesutul conjunctiv. Fibroblaştii formează pereţii de ţesut conjunctiv, care încapsulează materialele străine sau proliferează în cursul proceselor reparatorii, pentru a forma ţesutul conjunctiv nou.

b. Inflamaţia. Evoluţia reacţiilor inflamatorii

Inflamaţia este o reacţie locală complexă-vasculară, limfatică şi tisulară, care se produce la animale şi la om ca răspuns la o agresiune localizată de natură microbiană, chimică, fizică sau mecanică. Ea constă în acumularea la nivelul ţesutului lezat a unor celule specializate funcţional — fagocitele — şi a unui exudat inflamator bogat în substanţe bactericide sau bacteriostatice, precum şi în inducţia unor modificări chimice locale menite să limiteze acţiunea factorului de agresiune, protejînd astfel ţesutul de extinderea unei leziuni care ar putea să-i distrugă structura sau chiar să-i compromită vitalitatea. Caracteristicile procesului inflamator sînt aceleaşi, indiferent de natura factorului său determinant, care poate fi acţiunea termică, iradeirea, traumatizarea mecanică, iritaţia prin substanţe chimice sau pătrunderea şi multiplicarea unor microorganisme. Inflamaţia reprezintă un proces fundamental pentru menţinerea integrităţii organismului şi chiar pentru supravieţuirea lui, deoarece ea asigură neutralizarea efectelor agenţilor patogeni şi repararea ţesuturilor lezate.

Evoluţia reacţiilor inflamatorii, ca răspuns la o agresiune microbiană, poate fi studiată determinîndu-se pe cale experimentală apariţia unei inflamaţii prin inocularea unei mici cantităţi de cultură bacteriană sub pielea unui animal de laborator. Prezenţa bacteriilor în ţesutul subcutanat are ca urmare apariţia unor modificări biochimice locale datorită cărora capilarele şi venele mici se dilată, iar permeabilitatea peretelui lor pentru lichidele sanguine creşte, ceea ce determină acumularea în ţesutul interstiţial din teritoriul infectat a unui exudat inflamator care produce o tumefiere locală (edem). În plus, prezenţa bacteriilor în ţesut reprezintă un stimul şi pentru producerea masivă

de polimorfonucleare şi mononucleare mature, pornind de la precursorii lor din măduva osoasă sau de la sediile lor extramedulare, urmată de liberarea acestor celule în sînge. Procesul de fagocitoză implică un contact direct între fagocit şi bacterii, care se realizează fie prin transportul sanguin al bacteriilor la locul unde se găsesc fagocitele fixe, fie prin migrarea fagocitelor din sîngele circulant pînă în zona unde sînt localizate bacteriile. Primele celule care intră în acţiune sînt polimorfonuclearele neutrofile care părăsesc capilarul sanguin pentru a trece în ţesutul inflamat. Intervenţia lor se desfăşoară în mai multe etape succesive marcate de fenomene caracteristice pentru aptitudinile funcţionale ale acestui tip de celule.

Marginaţia. În capilarul normal, hematiile sînt transportate prin zona lui centrală, iar leucocitele sînt „rostogolite" periferic, de-a lungul peretelui său, într-un strat relativ clar de plasmă. În cursul inflamaţiei, circulaţia centrală a hematiilor nu se modifică în capilarele dilatate, dar leucocitele capătă tendinţa de a adera pe faţa internă a peretelui capilar, unde formează un şir aproape continuu. Mecanismul acestui fenomen de marginaţie este puţin cunoscut, dar el pare a implica modificări afectînd proprietăţile de suprafaţă ale celulelor endoteliale, care ar deveni mai „lipicioase", ca şi, poate, ale leucocitelor.

Diapedeza. Migrarea leucocitelor din interiorul capilarelor sanguine în ţesuturile irigate de acestea, fenomen numit *diapedeză* de la gr. *diapedesis*=trecere prin), era considerată ca o traversare — prin mişcările pseudopodelor leucocitare — a soluţiilor de continuitate rezultate din distrugerea endoteliilor vasculare sau a cimentului intercelular parietal. După Marchesi şi Florey (1961), punctul în care leucocitul străbate peretele capilar este joncţiunea dintre celulele endoteliale, care se desfac — pentru a permite trecerea unui pseudopod leucocitar — printr-un mecanism necunoscut, presupus a consta din acţiunea unei forţe mecanice sau dintr-o reacţie enzimatică de degradare a substanţelor de legătură. Joncţiunile dintre celulele endoteliale constau din substanţă acelulară, acoperind intervale regulate de 30—50 Å, uneori opacă pentru electroni, dispusă în formă de benzi sau centuri de ataşare. După injectarea unor substanţe cu acţiune inflamatoare, între celulele endoteliale apar deschizături de 8—20 Å, în special la

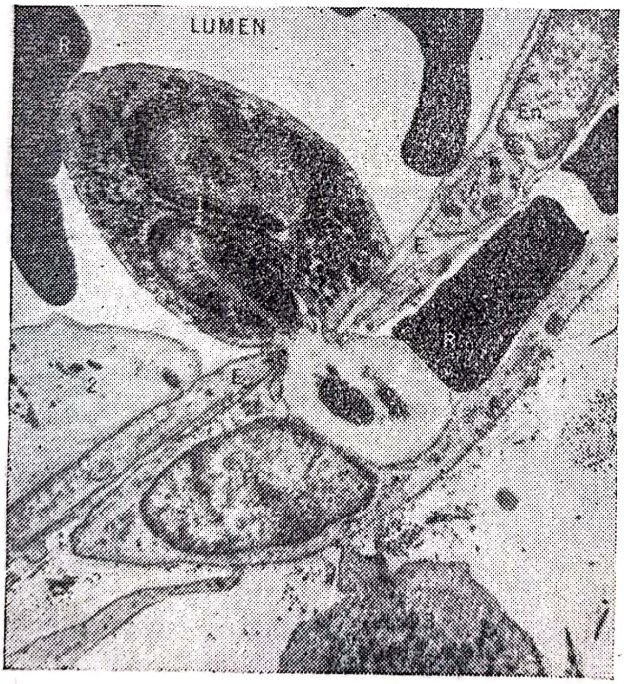


Fig. 375. Leucocit polimorfonuclear *(1)* trecînd printre celulele endoteliale *(E)* ale unei venule dintr-o zonă inflamată şi venind în contact cu celulele periendoteliale *(P. C.)*. Hematiile *(R)* se găsesc în venulă ca şi în spaţiul periendotelial; *2* — polimorfonuclear marginat; *3* — polimorfonuclear trecut prin diapedeză în ţesutul conjunctiv (după Marchesi).

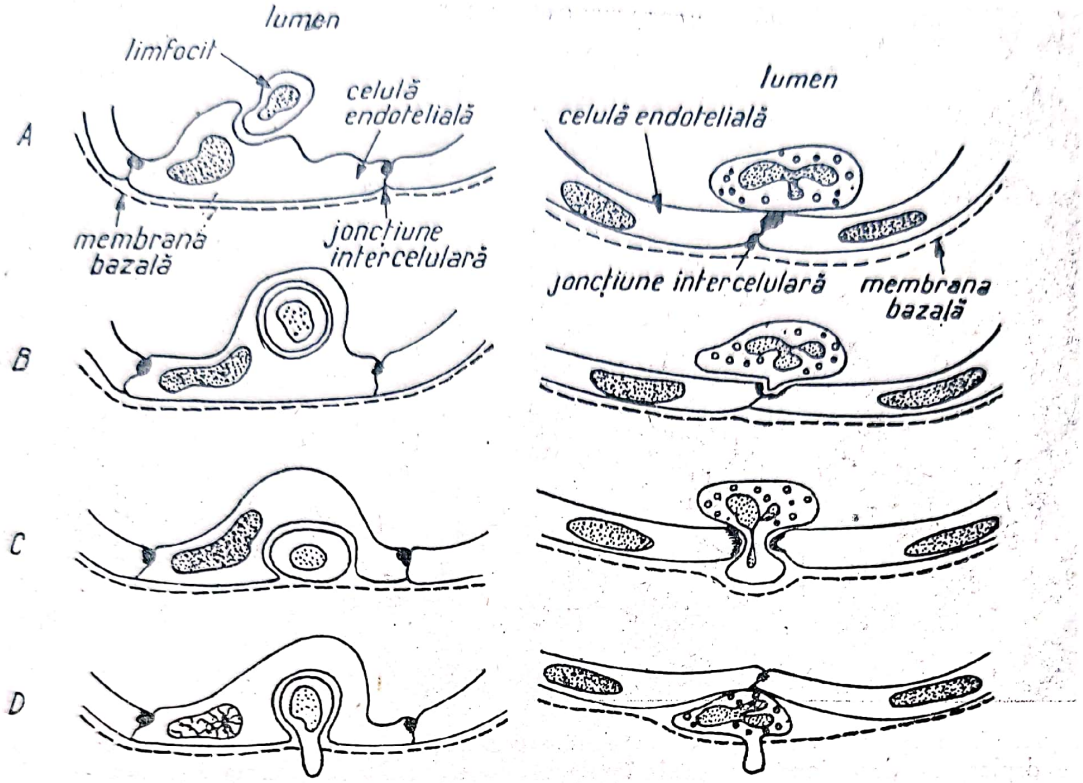


Fig. 376. Fazele procesului de diapedeză: *stînga* — etapele parcurse de un limfocit care părăseşte venulele postcapilare ale ganglionului limfatic normal; *dreapta* — diapedeza granulocitelor şi monocitelor în cursul inflamaţiei. În faza a treia *(C)* toate tipurile de celule sînt reţinute de membrana bazală şi de teaca periendotelială, pe care o străbat în faza ultimă *(D)* (după Marchesi).

nivelul venulelor, care reprezintă probabil principalul tip de vase care participă la faza precoce a inflamaţiei (M a j n o şi P a l a d e). Leucocitele care migrează prin joncţiunile endoteliale sînt reţinute temporar de membrana bazală a endoteliului, după care trec în substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv. Faza de diapedeză durează 2—12 minute.

Mobilitatea. O dată trecute în ţesutul interstiţial perivascular, polimorfonuclearele se deplasează activ spre zona în care se găseşte agentul patogen. Mobilitatea reprezintă una dintre proprietăţile cele mai evidente ale leucocitelor care se pot tîrî pe peretele vaselor sangvine, în ţesuturi sau pe diferite suporturi (sticlă). Ele au tendinţa să-şi modifice direcţia la fiecare 20 μ, emiţînd la întîmplare un *pseudopod,* astfel încît celula „merge" în zigzag. În condiţii ideale, viteza de deplasare a polimorfonuclearelor este de 36—40 μ/minut (D i t t r i c h, 1962), în timp ce monocitele şi macrofagele se mişcă mult mai încet.

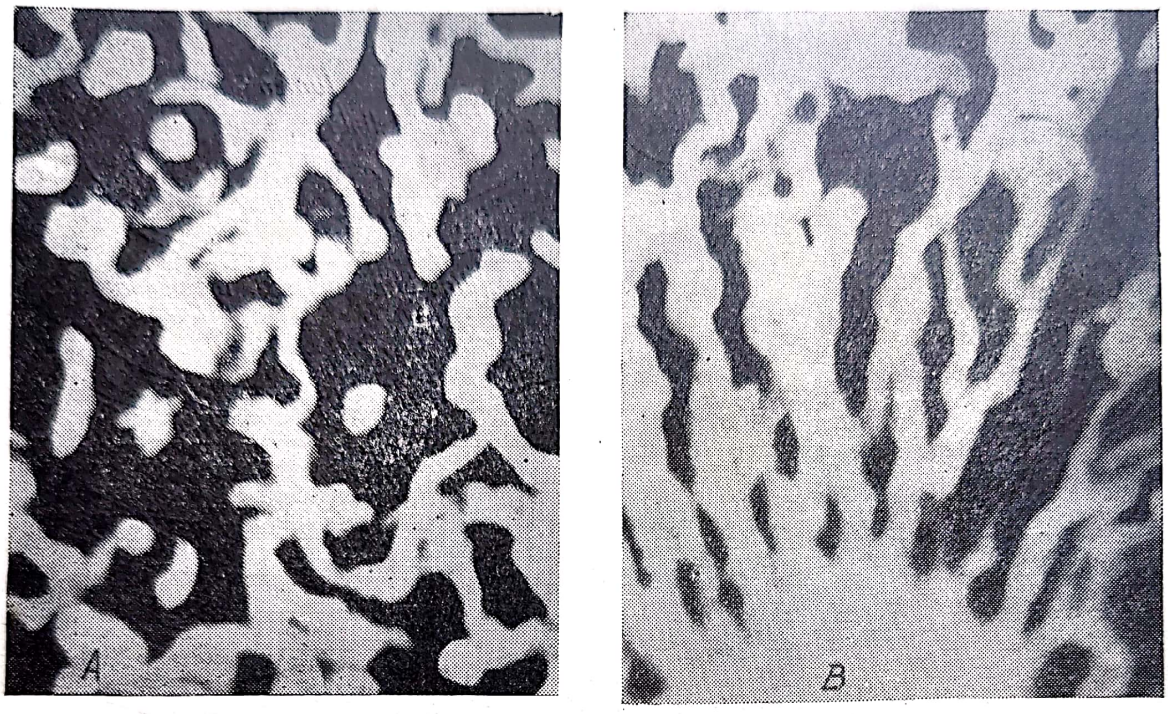


Fig. 377. Înregistrarea fotografică a drumului parcurs de cîteva monocite (zonele albe) care se deplasează dezordonat — la întîmplare *(A)* şi orientat în urma răspunsului chimiostatic pozitiv produs de prezenţa unei aglomerări de bacterii *(B)*.

Chemotaxia [1]. Începînd de la o distanţă de aproximativ 100 μ faţă de un grup de bacterii, caracterul întîmplător al deplasării leucocitului dispare şi celula fagocitară începe să înainteze în linie dreaptă spre locul unde se află bacteriile. Posibilitatea locomoţiei orientate ar fi asigurată de existenţa în neutrofile a unui sistem încă necunoscut capabil să determine deplasarea dirijată a celulei într-un gradient de concentraţie chimică, de la zona cu concentraţie mică spre cea cu concentraţie maximă, acest gradient fiind generat de difuzia în mediu a unor substanţe din particulele susceptibile de a fi fagocitate sau, dimpotrivă, de adsorbţia pe aceste particule a unor substanţe din mediu.

Fagocitoza (înglobarea de particule). După stabilirea contactului direct cu bacteria, fagocitul emite pseudopode în jurul ei, astfel încît bacteria este cuprinsă într-o invaginare a membranei citoplasmatice care se adînceşte apoi progresiv în citoplasmă. În cele din urmă, deasupra capătului distal al bac-

[1] Pentru celulele mobile *chemotaxia* reprezintă o proprietate deosebit de importantă, deoarece mişcarea lor trebuie să fie orientată cu precizie şi rapiditate spre locul infecţiei. Unele celule şi substanţe derivate din ele, aşa cum sînt, de exemplu, bacteriile şi componentele lor proteice şi lipopolizaharidice, au efecte chemotactice directe. În afară de aceasta, în cursul infecţiilor bacteriene se liberează în ser mediatori chimici derivaţi probabil din ţesuturile necrozate şi din lizozomi; după Keller şi Jorkin (1967) aceştia reprezintă *citotoxine*, produşi cu acţiune chemotactică directă asupra celulelor fagocitare, elaboraţi sub acţiunea inductoare a unor substanţe *citotaxigene*.

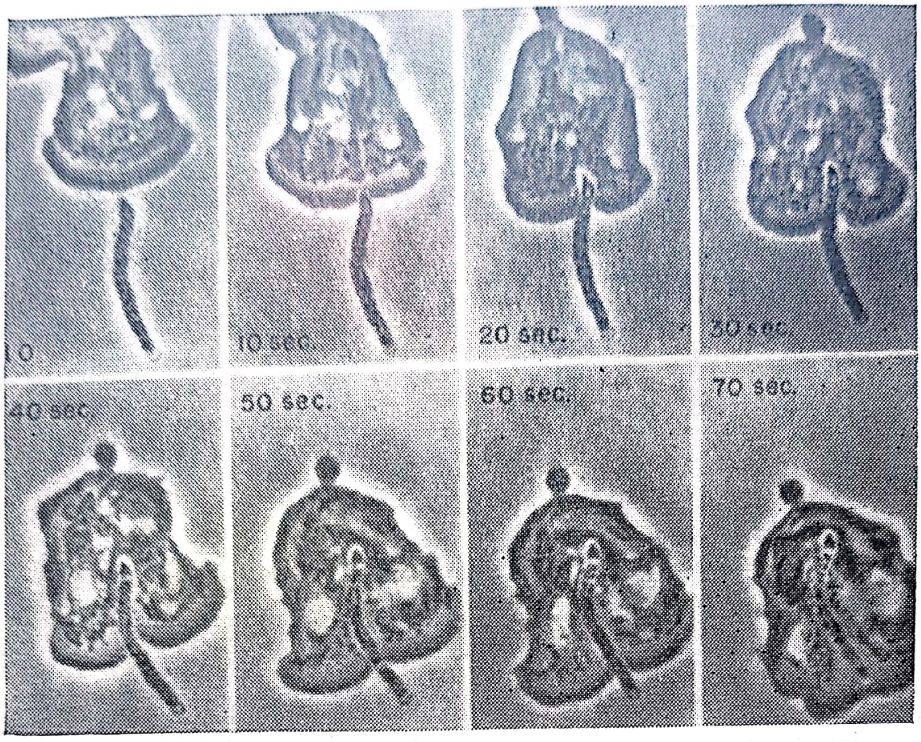


Fig. 378. Fazele fagocitozei unei celule de *B. megaterium* de către un leucocit neutrofil. Se observă reducerea progresivă a numărului de granulații citoplasmatice pe măsură ce înglobarea bacteriei progresează (după Hirsch).

teriei în curs de încorporare în fagocit cele două margini opuse ale invaginării parietale se apropie și fuzionează, ceea ce determină includerea bacteriei fagocitate într-o pungă sau *vezicule fagocitară* al cărui perete este format din membrana citoplasmică invaginată; membrana celulară întreruptă prin formarea veziculei se reface prin sinteză la locul unde s-a produs invaginarea. Procesul este analog aceluia de pinocitoză prin care sînt ingerate discontinuu, sub formă de picături, substanțe macromoleculare în stare de soluție. Înglobarea bacteriei în fagocit implică stabilirea prealabilă a unui contact foarte strîns, deoarece este necesară neutralizarea forțelor electrostatice de respingere dintre cele două celule încărcate electronegativ. Fagocitoza este, pe de altă parte, mult favorizată de *procesul de opsonizare* care face bacteriile mai susceptibile de a fi fagocitate, probabil prin simpla adsorbție la suprafața celulei bacteriene a unor substanțe din ser, cum sînt anticorpii și complexul denumit *complement* sau *alexină*.

În timpul ingestiei și după aceea, metabolismul fagocitului este profund modificat: consumul de O_2 și de glucoză crește, glicogenoliza și producerea de acid lactic se intensifică, iar utilizarea glucozei pe calea *shunt*-ului hexozomonofosfaților și metabolismul lipidelor sînt activate. Aceste modificări metabolice reflectă nevoia sporită de energie a celulei fagocitare în legătură cu desfășurarea procesului de fagocitoză, și deopotrivă, probabil, cu sinteza de membrane lipoproteice sau a altor structuri noi.

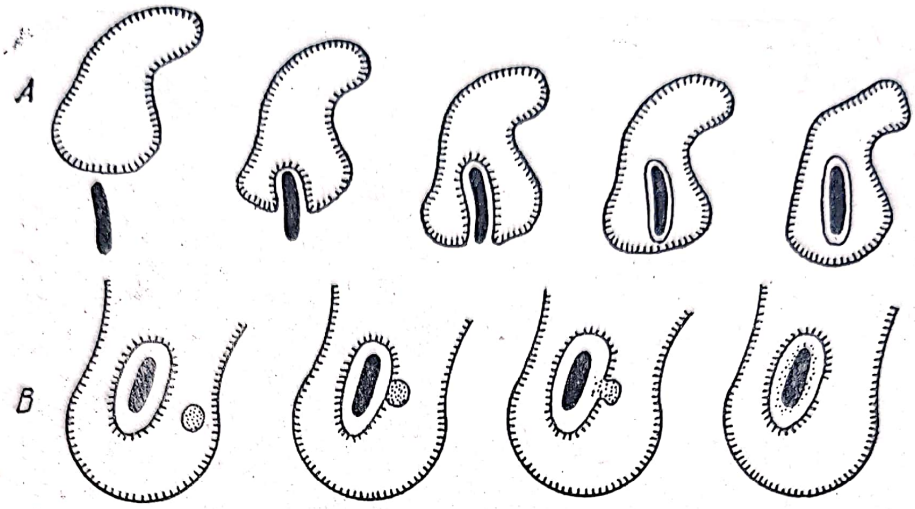


Fig. 379. Reprezentarea schematică a fagocitării unei bacterii de către un polimorfonuclear neutrofil *(A)* — după imagini luate la interval de 30 secunde, şi fazele succesive ale procesului de degranulare *(B)*.

Degranularea fagocitului. După încorporarea bacteriilor, la toate tipurile de fagocite (neutrofile, eozinofile şi mononucleare) urmează un proces de liză foarte rapidă, aproape explosivă, a granulelor citoplasmice aglomerate în jurul vacuolei de fagocitoză. Enzimele hidrolitice şi substanţele antimicrobiene din constituţia acestor granule sînt eliberate pe această cale în interionul vacuolei (pungii) fagocitare. Degranularea are loc numai atunci cînd membrana de înveliş a granulelor citoplasmice vine în contact intim şi fuzionează cu peretele veziculei fagocitare sau cu zonele clare din celulă rezultate din liza anterioară a unei granule. Acest mecanism, care explică evoluţia controlată a lizei granulelor, asigură transferul direct al enzimelor digestive din granule în punga

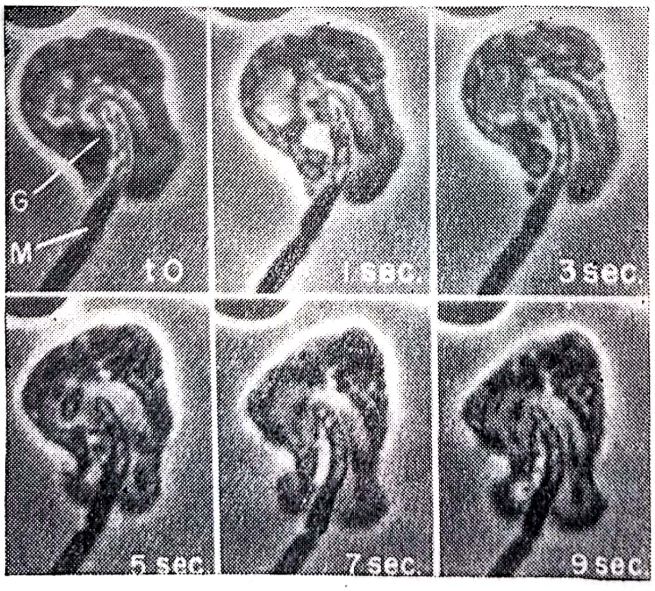


Fig. 380. Liza granulaţiilor citoplasmatice *(G)* ale unui leucocit polimorfonuclear în timpul ingestiei unei celule *(M)* de *Bacillus megaterium*. Se observă apariţia unei zone clare în jurul porţiunii de bacil fagocitat şi modificările consecutive în structura celulei bacteriene (după Hirsch).

fagocitară, fără expunerea citoplasmei fagocitului la alterări de tip autolitic. Procesul de digestie intraleucocitară este asemănător digestiei extracelulare a animalelor înzestrate cu tub digestiv: ingestia hranei este urmată de liberarea enzimelor digestive în cavitatea în care se găseşte alimentul.

Digestia şi egestia particulei înglobate. Soarta unei particule înglobate de un neutrofil depinde de natura chimică a materialului încorporat. Unele particule de substanţe inerte (cărbune, polistiren etc.) pot fi fagocitate, dar rămîn nemodificate în celulă timp de mai multe ore. Bacteriile sînt omorîte în general după aproximativ 15 minute de la înglobare, în special sub acţiunea lizozimului, a leukinei, a fagocitinei, a peroxizilor şi a acizilor organici liberaţi din procesul de glicoliză (în jurul particulei înglobate valoarea *p*H este de 4—5). După 3—60 de minute, în cursul cărora au suferit modificări morfologice şi tinctoriale (îndeosebi pierderea bazofiliei), bacteriile înglobate sînt dezintegrate, iar după mai multe ore sînt digerate complet. Constituenţii lor macromoleculari (proteine, acizi nucleici etc.) sînt degradaţi la molecule mai mici, care sînt excretate sau folosite de neutrofil pentru procesele sale metabolice. Leucocitul care a distrus şi digerat bacteria înglobată poate relua acest ciclu de la început. În cazul în care particula ingerată este toxică, acţiunea enzimelor leucocitare este împiedicată, fagocitul suferă modificări importante ale citoplasmei şi nucleului şi, în cele din urmă, moare. Uneori, după ce au fost reţinute cîtva timp în neutrofile, bacteriile fagocitate pot fi eliminate înapoi în mediu prin *egestie* (W i l s o n, 1953), proces echivalent cu regurcitarea hranei în exces la organismele superioare sau cu excreţia resturilor ei.

Prin ansamblul fenomenelor pe care le implică, inflamaţia reprezintă o reacţie foarte utilă pentru organismul invadat. Ea este însoţită de modificări

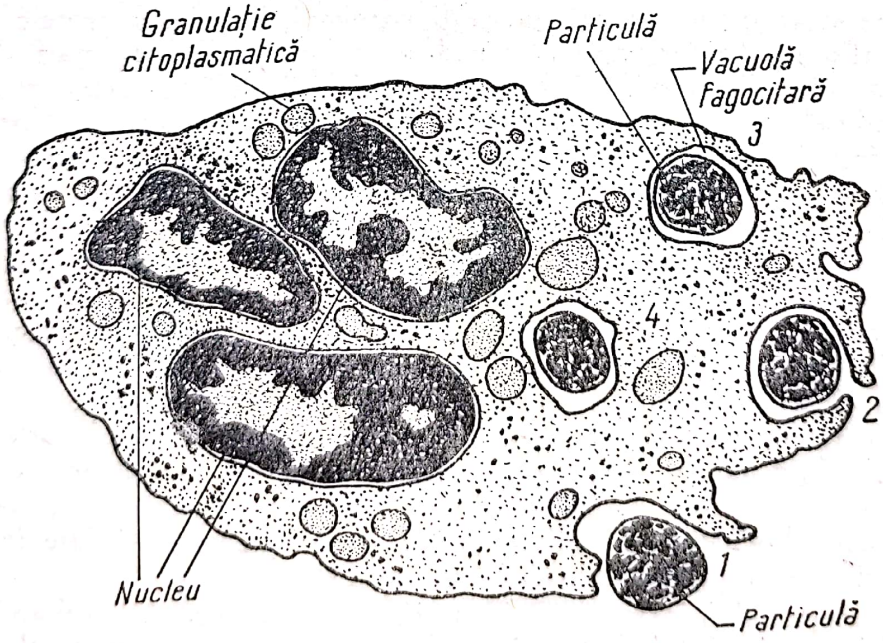


Fig. 381. Reprezentarea schematică a unui polimorfonuclear în diferite faze succesive *(1—4)* ale fagocitozei unei particule (după Zucker-Franklin).

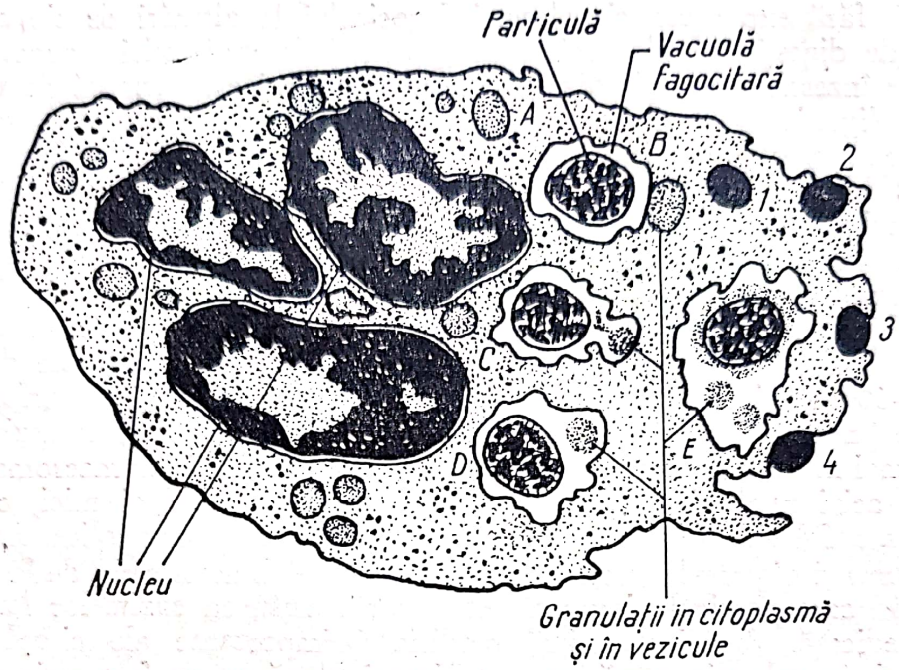


Fig. 382. Modul de eliminare a granulațiilor și particulelor în vacuole sau la exteriorul celulei prin exoplasmoză:
A—E — fazele de trecere a granulațiilor din citoplasmă în vacuola fagocitară;
1—4 — fazele de eliminare ale particulelor din celulă, cu păstrarea continuității membranei celulare (după Zucker-Franklin).

microscopice importante, care determină un aflux de celule fagocitare, capabile să înglobeze și să digere agenții umorali patogeni. Exudatul proteic aduce în teritoriul inflamat factori antibacterieni în concentrații mai mari decît cele normale, iar fluxul sangvin și limfatic mărit diluează și îndepărtează prin spălare produsele toxice. În același timp, formarea unei rețele de fibrină localizează și imobilizează bacteriile, favorizînd fagocitarea lor, iar hipertermia locală influențează negativ multiplicarea unora dintre ele. În cazurile mai severe însă, în aproximativ 48 de ore de la inoculare, se formează un abces constituit din țesuturi mortificate și leucocite moarte și lizate. Țesutul inflamat este distrus de toxinele bacteriene, iar leucocitele mor fie sub acțiunea toxinelor bacteriene antileucocitare (*leucocidine*), fie ca rezultat al creșterii bacteriilor în interiorul lor fie, însfîrșit, pentru că și-au terminat durata normală de viață. Polimorfonuclearele moarte eliberează diferite enzime (proteaze, lipaze, polipeptidaze) care produc digestia celulelor moarte, a fibrinei și a celorlalte structuri distruse, dînd naștere unui produs final semilichid, de culoare galbenă sau cenușie, care este puroiul. La examenul microscopic, puroiul apare format din resturi amorfe, din leucocite polimorfonucleare și alte celule aflate în diferite etape de dezintegrare și din bacterii intra- sau extracelulare.

În cursul procesului inflamator, bacteriile ajung adesea în capilarele limfatice care irigă teritoriul infectat și sînt transportate pe această cale în ganglionii limfatici regionali. Ele se localizează aici temporar, determinînd inflamația vaselor limfatice (*limfangită*) și a ganglionilor (*limfadenită*), însoțită de

afluxul a numeroase fagocite sangvine de toate tipurile. La nivelul ganglionilor, bacteriile sînt înglobate de macrofagele fixe, aranjate într-un adevărat sistem de filtrare, iar dacă scapă de acţiunea acestor celule, ele pot trece mai departe în sînge. Bacteriile ajunse în sînge sînt captate în special de macrofagele fixe din capilarele sinusoide ale unor organe ca splina şi ficatul. Acţiunea fagocitară a acestor celule este favorizată de viteza foarte mică a circulaţiei sangvine în capilarele sinusoide dilatate (sub 0,1 cm/s, faţă de 0,3—5 cm/s în vene şi 10—40 cm/s în artere) şi chiar de stoparea ei momentană în unele capilare, realizată printr-un mecanism similar închiderii unei valve. Fagocitele circulante, deşi în număr mare, au un rol redus în acest proces, datorită faptului că posibilităţile lor de contact cu bacteriile sînt foarte limitate, ca urmare a transportului pasiv al fiecărora dintre ele în fluxul sangvin.

c. Modificări biochimice asociate cu procesul inflamator

Iniţial s-a crezut că fenomenele caracteristice reacţiei inflamatorii se datoresc histaminei şi 5-hidroxitriptaminei prezente în unele celule şi liberate în plasmă sub influenţa unor reacţii iniţiate de factorul determinant al inflamaţiei. Cer-

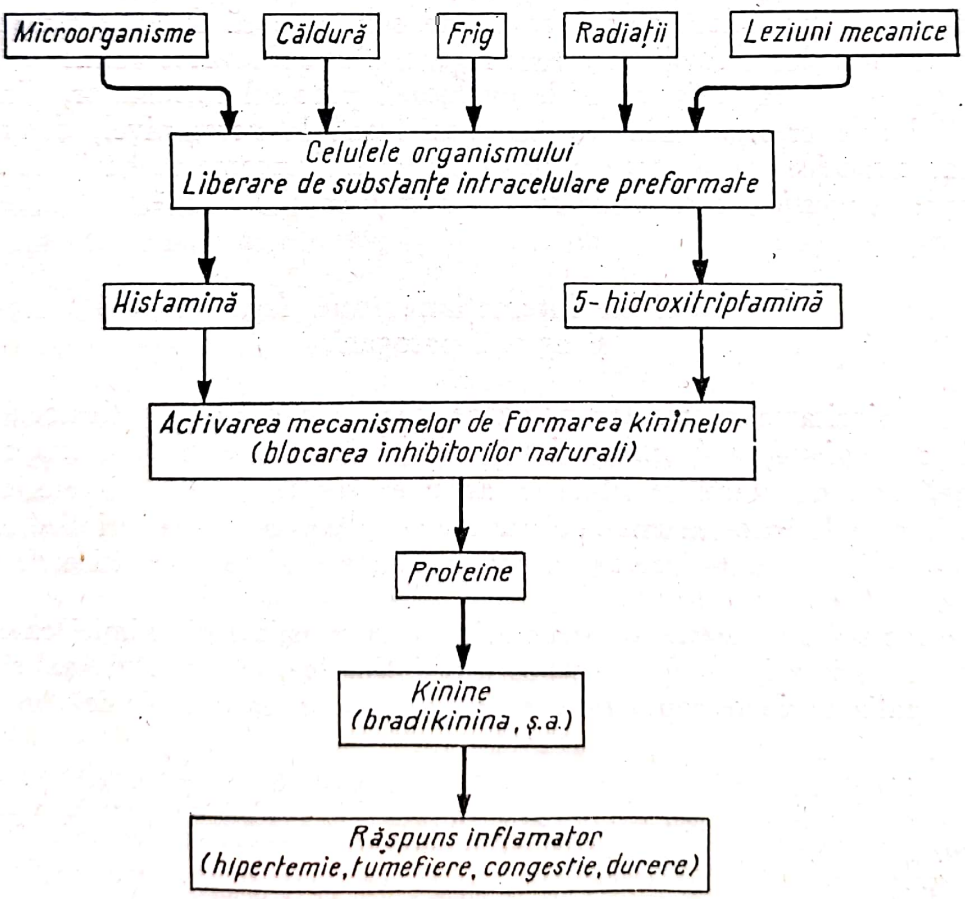


Fig. 383. Mecanismul de apariţie a modificărilor biochimice răspunzătoare de fenomenele răspunsului inflamator.

cetări recente demonstrează că *histamina* şi *5-hidroxitriptamina* (5-HOTA) acţionează în special punînd în acţiune un al doilea lanţ de reacţii prin care proteinele din sîngele care irigă ţesuturile, ca şi cele din lichidul interstiţial care înconjură celulele, ar fi degradate la peptide, formate din 8—10 aminoacizi. Dintre aceste peptide, cea mai activă din punct de vedere biologic este *bradikinina* alcătuită din 9 aminoacizi *(arg-prol-prol-glic-fenilal-ser-prol-fenilal-arg)* care, inoculată în stare pură, produce vasodilataţie, mărirea permeabilităţii capilarelor, durere şi aflux leucocitar. Se admite astăzi că organismul animal dispune, la nivelul sîngelui şi al lichidelor interstiţiale, de un mecanism complex pentru degradarea proteinelor la peptide biologic active *(kinine)*, dar că în mod normal acţiunea acestui mecanism este blocată de inhibitori.

Leziunile tisulare care liberează din celule substanţe performate ca histamina şi 5-HOTA, activează mecanismul de degradare a proteinelor sangvine şi intratisulare, ceea ce determină producerea locală de kinine. În cazul în care cantităţi mari de kinine ar pătrunde în torentul circular şi ar fi răspîndite prin sînge în tot organismul, ele ar produce dilataţia difuză a vaselor, hipotensiune şi stare de şoc. Pentru a preîntîmpina o astfel de eventualitate, organismele animale sînt dotate cu sisteme de reacţie speciale care asigură inactivarea rapidă a kininelor înainte ca aceste substanţe să fi avut timpul să-şi exercite acţiunea lor difuză, cu caracter generalizat. Deoarece asemenea sisteme nu pot acţiona şi în regiunea unde evoluează procesul inflamator, din cauza acidităţii locale crescute, kininele se acumulează la acest nivel, determinînd efecte caracteristice care se traduc prin cele patru simptome de bază ale oricărei inflamaţii: *congestie, hipertermie locală, tumefiere* şi *durere* [1].

d. Tipuri de interacţiune între fagocite şi agenţii patogeni

Pentru majoritatea bacteriilor patogene, care sînt paraziţi obligatoriu extracelulari, supravieţuirea intrafagocitară este de scurtă durată, întrucît celula bacteriană este de obicei sensibilă la acţiunea substanţelor antibacteriene din fagocit. Bacteriile omorîte sînt apoi supuse unui proces de bacterioliză intracelulară, consecinţă a autolizei sau a acţiunii unor enzime hidrolitice de provenienţă leucocitară.

Unele bacterii sînt dotate cu structuri sau cu constituenţi chimici care reduc eficienţa fagocitozei, comportîndu-se ca *antifagine* (Suter). Aşa sînt, de exemplu, polizaharidele capsulare ale pneumococilor, care împiedică înglobarea

[1] În apariţia durerii locale sînt implicate scăderea *p*H, alterarea locală a echilibrului ionic (Na^+, Ca^{++}, K^+) şi, mai ales, distensia tisulară mecanică, produsă de acumularea lichidului inflamator, care determină iritarea terminaţiilor nervoase. Dovada o constituie faptul că procesele inflamatorii produse în regiuni cu o structură anatomică mai densă (ca nasul, conductul auditiv extern), care sînt puse în tensiune chiar de acumulări puţin importante de lichide, sînt foarte dureroase şi că, în general, durerea încetează imediat după ce distensia dispare, prin deschiderea spontană sau chirurgicală a focarului inflamator şi liberarea puroiului.

Scanned with OKEN Scanner

bacteriei în fagocit, streptolizinele streptococilor, care lizează granulaţiile citoplasmatice ale polimorfonuclearelor, inducînd astfel autoliza acestor celule sub acţiunea enzimelor digestive eliberate în citoplasmă din granulele lizate, *endotoxinele* care inhibă migrarea leucocitelor, *leucocidinele* care atacă leucocitele producînd pionoză şi degenerarea celulară, urmată de pierderea activităţilor fiziologice etc.

Uneori agentul patogen nu este omorît prin fagocitoză, aşa cum este cazul bacilului tuberculozei (*Myc. tuberculosis*) care supravieţuieşte mult timp în granulocite şi macrofage, al bacteriilor din genul *Brucella* etc. În sfîrşit, virusurile pot persista vreme îndelungată în leucocite şi astfel sînt vehiculate în tot organismul.

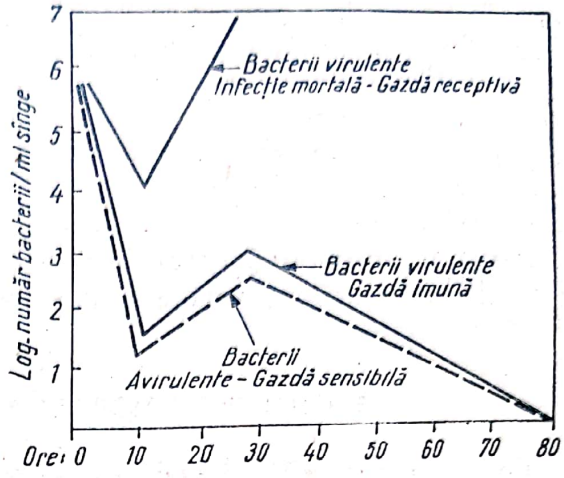


Fig. 384. Dispariţia bacteriilor din circuitul sanguin: în organismele receptive după o scădere numerică iniţială bacteriile se multiplică rapid şi determină moartea gazdei. În organismele imune, bacteriile virulente dispar din sînge în acelaşi ritm ca şi bacteriile avirulente în organismele neimunizate.

e. Importanţa factorilor celulari în imunitate

Fagocitoza reprezintă cea mai importantă reacţie de apărare a organismului uman şi animal faţă de agresiunile bacteriene. Ea are rolul de a limita procesul infecţios, de a libera de germeni sîngele şi ţesuturile organismului invadat şi de a curăţa de resturile celulare ţesuturile inflamate. În afară de aceasta, alte tipuri de celule participă în procesele de reparare şi cicatrizare a ţesutului inflamat şi elaborează substanţe protectoare specifice de tipul anticorpilor.

Viteza de epurare a sîngelui şi ţesuturilor de bacterii depinde de virulenţa parazitului pentru gazdă, ca şi de rezistenţa naturală a acesteia. Astfel, în timp ce numărul celulelor de *E. coli* introduse intravenos la iepure poate să scadă în sînge de la 1 milion/ml la zero după 30 de minute, numărul microorganismelor foarte virulente scade la început, pentru ca după aceea să crească, multiplicarea lor masivă putînd determina chiar moartea animalului. La animalele sacrificate după 30 de minute, cel mai mare număr de germeni (*E. coli*) este găsit în splină, ficat şi pulmon, iar cel mai mic în muşchi, creier şi sînge, ceea ce dovedeşte rezistenţa naturală diferită a diverselor organe faţă de agresiunea bacteriană.

Importanţa procesului de fagocitoză în imunitate a fost enunţată sintetic de J. Bordet (1939), sub forma a cîteva concluzii care rămîn valabile şi astăzi: *1*) există un paralelism strîns între intensitatea procesului de fagocitoză şi gradul de rezistenţă antiinfecţioasă a organismului. Nu există exemple de vindecare a unei infecţii bacteriene (sterilizare) fără intervenţia fagocitelor; *2*) pentru distrugerea microbilor nu este suficientă puterea de sterilizare a

umorilor, suprimarea germenilor fiind asigurată de digerarea lor intracelulară după fagocitoză; *3*) rezistența unei regiuni crește în raport direct cu numărul de leucocite prezente în ea. Orice factor care provoacă îndepărtarea sau distrugerea fagocitelor din regiunea respectivă (frig, căldură, toxine etc.) are drept urmare favorizarea infecției; *4*) în unele cazuri, virulența deosebită a unor bacterii este legată de prezența unor proprietăți antifagocitare (capsulă, endotoxine, leucocidine etc.). Microbii nepatogeni nu luptă împotriva fagocitelor; *5*) în mod general, creșterea numărului de leucocite în cursul unei infecții bacteriene este semnul unei evoluții favorabile a bolii și invers.

3. FACTORII UMORALI AI IMUNITĂȚII. ANTICORPII

Pe lîngă factorii celulari, în determinarea stării de imunitate față de un anumit agent patogen mai joacă un rol însemnat și factorii umorali reprezentați de anumite substanțe protectoare specifice — numite a n t i c o r p i — care se formează în sînge și umori ca rezultat al pătrunderii în organism a unui *antigen* (microorganism sau unele produse ale lui).

a. Date generale asupra antigenelor

Antigenele sînt substanțe care, introduse pe cale parenterală în organismul uman sau animal, stimulează elaborarea în celule specializate, și apariția consecutivă în sînge și umori a unor substanțe denumite *anticorpi*, cu care reacționează specific. Această acțiune de stimulare se datorește faptului că substanțele antigenice sînt străine — sînt *non-self* — din punct de vedere chimic pentru organismul în care au pătruns. Susbstanțele proprii corpului unui animal nu determină în condiții normale formarea de anticorpi în organismul respectiv [1]. Dacă însă la un iepure, de exemplu, se inoculează intravenos globule roșii de berbec (antigen), în sîngele iepurelui vor apărea hemolizine (anticorpi), capabile să se combine cu antigenul respectiv — hematia de berbec — și să producă liza sau topirea ei. Introducerea antigenelor în organism este eficientă în special pe cale parenterală și, mult mai rar, pe cale digestivă deoarece cele mai multe dintre ele sînt distruse de enzimele digestive.

Microorganismele au în compoziția lor chimică substanțe care sînt străine pentru organismul uman sau animal. Datorită acestui fapt, dacă aceste sub-

[1] În cazuri speciale, organismul uman și animal poate să răspundă prin formare de *anticorpi* și la apariția anormală în sînge a așa-numitelor *autoantigene*, care sînt constituenți proprii din categoria celor care în mod normal nu sînt prezenți în circulație. Această reacție de răspuns la stimularea prin autoantigene reflectă o funcție importantă a aparatului „imun": aceea de a reacționa prin formarea de anticorpi în prezența oricărei substanțe macromoleculare care în mod normal nu este expusă liberă în corp, pentru a proteja țesuturile de orice acțiune nocivă indiferent dacă substanța care o exercită este intrinsecă sau extrinsecă. Această proprietate nu este totuși întotdeauna benefică pentru gazdă, așa cum se întîmplă, de exemplu, atunci cînd ea se manifestă prin unele reacții de alergie, prin reacții de respingere a grefelor etc.

Scanned with OKEN Scanner

stanţe pătrund în organism pe cale naturală (în cazul infecţiei) sau artificială (prin vaccinare), ele se comportă ca antigene şi stimulează formarea unei cantităţi însemnate de anticorpi. O dată formaţi, anticorpii pot influenţa evoluţia infecţiei sau intoxicaţiei cu produşi bacterieni, deoarece ei se combină cu antigenul specific reprezentat de bacterie sau de toxina bacteriană, fie distrugîndu-l direct sau prin intermediul fagocitozei, fie neutralizîndu-i efectul toxic.

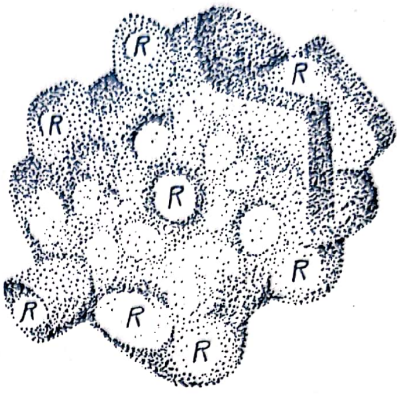


Fig. 385. Reprezentare schematică a unui antigen: *R* — grupările determinante de specificitate (după Cushing).

Compoziţia chimică a antigenelor. Cele mai multe antigene naturale sînt de natură proteică. Există însă şi unele substanţe neproteice, cum sînt polizaharidele, care sînt capabile să inducă formarea de anticorpi, dar numai la anumite specii de animale. Se presupune că în organismul acestor animale s-ar realiza o cuplare a polizaharidului exogen cu o proteină proprie, realizîndu-se astfel un complex proteină-polizaharid cu proprietăţi antigenice. Potenţialul antigenic al unei substanţe este determinat de un anumit aranjament de suprafaţă al atomilor din structura ei, diferit de configuraţia superficială a moleculei oricăreia dintre componentele normale ale organismului care vine în contact cu această substanţă.

Antigenele naturale, ca şi cele sintetice, sînt deci macromolecule sau grupuri de macromolecule, adică substanţe cu un anumit grad de complexitate structurală şi cu dimensiuni moleculare relativ mari. Caracterul de antigenitate este legat nu de configuraţia de ansamblu a întregei suprafeţe a moleculei, ci numai de dispoziţia individuală a anumitor grupuri specifice de atomi care reprezintă *determinanţii antigenici* sau *grupările determinante de specificitate* ale antigenului. În cazul proteinelor, caracterul de specificitate antigenică rezultă din aranjarea caracteristică a unui grup de 3—4 resturi de aminoacizi la suprafaţa moleculei, determinantul antigenic constituind o zonă activă, limitată de 100—200 Å şi polarizată electric. Ca atare, o moleculă dată de proteină şi mai ales o celulă bacteriană poate poseda mulţi determinanţi antigenici diferiţi, dispuşi separat la suprafaţa ei şi, ca urmare, ea poate determina formarea unui număr corespunzător de anticorpi diferiţi. Dintre toate aranjamentele posibile de 3—4 aminoacizi grupaţi, acţionează ca grupări determinante de specificitate numai acelea care sînt orientate spre exteriorul moleculei şi care nu au echivalenţă în structura de suprafaţă a proteinelor din organismul formator de anticorpi. Cercetări efectuate cu ajutorul antigenelor obţinute prin sinteză chimică au arătat că două antigene de deosebesc între ele în măsura în care grupările lor determinante sînt chimic deosebite şi se aseamănă în măsura în care aceste grupări sînt similare, în special în ceea ce priveşte extremitatea lor distală. S-a stabilit, de asemenea, că moleculele mici devin antigenice numai după cuplarea covalentă cu o moleculă mai mare, de exemplu o proteină, care le serveşte drept suport coloidal. În felul acesta, moleculele

mici sau numai o parte a lor devin determinanţi antigenici ai proteinei cu care s-au cuplat [1].

Antigenele bacteriene sînt reprezentate în special de *exotoxine* (antigene de natură proteică eliminate în mediu din celula bacteriană), antigenele *somatice* (endotoxine, componente celulare de natură glucidolipidolipeptidică), antigenele *flagelare* (proteina ciliară sau flagelară a bacteriilor mobile) şi antigenele *capsulare* (polizaharide cu caracter de haptenă pentru unele specii animale).

b) Date generale asupra anticorpilor

Anticorpii sînt substanţe a căror sinteză în organismul uman sau animal este indusă de apariţia în circuitul sanguin a unui antigen şi care au proprietatea de a reacţiona în mod strict specific cu antigenul care a stimulat formarea lor.

Proprietăţile fizico-chimice ale anticorpilor. Din punctul de vedere al naturii lor chimice, anticorpii sînt *gamaglobuline* care, datorită originii şi funcţiei lor, au fost denumite *imunoglobuline* (*Ig*) [2]. În funcţie de caracteristicile lor fizico-chimice ele sînt repartizate în patru clase:

1) *Imunoglobulinele IgG sau* γ *G* (sin. γ_2 sau *7S*), gamaglobulinele propriu-zise reprezentînd fracţiunea cea mai importantă la om (circa 85%), cu gr. mol. 160 000 şi constantă în sedimentare *7S*, corespunzînd prototipului anticorpilor clasici.

2) *Imunoglobulinele IgM sau* γ *M* (sin. $\gamma_1 M$ sau $\beta_2 M$), anticorpii „grei" cu greutatea moleculară de circa 10^7 şi constanta de sedimentare 19*S*, reprezentînd circa 5—10% din totalitatea imunoglobulinelor.

3) *Imunoglobulinele IgA sau* γ *A* (sin. $\beta_1 A$ sau $\beta_2 A$), cu gr. mol. 150—500 000 şi constanta de sedimentare 7—15*S*, reprezentînd aproximativ 10% din totalitatea imunoglobulinelor sangvine.

4) *Imunoglobulinele IgD sau* γ *D*, cu gr. mol. probabilă 160 000 şi constanta de sedimentare *7S*.

Modelul de structură spaţială a γ*-globulinelor.* Edelman (1964) a propus pentru molecula anticorpilor *7S* de iepure un model de structură care are probabil un caracter general. În acord cu acest model, molecula de anticorp ar avea în general forma unui cilindru, cu dimensiunile de 240 Å×52 Å×30 Å şi un volum de $2 \cdot 10^5$ Å^3, şi ar fi alcătuită din patru lanţuri popipeptidice legate între ele prin punţi disulfidice (—S—S—). Fiecare lanţ polipeptidic este

[1] Substanţele care, deşi reacţionează cu anticorpii specifici preformaţi, nu pot induce singure formarea acestora în organism, sînt cunoscute sub denumirea de *haptene* sau *semiantigene*. Din categoria haptenelor fac parte numeroşi compuşi cu greutate moleculară mică, de natură glucidică (polizaharide bacteriene) sau lipidică, indiferent dacă sînt substanţe chimice naturale sau produşi de sinteză. Ele devin *antigenice* în organism numai după ce s-au cuplat cu un suport, de obicei o proteină, împreună cu care alcătuiesc antigene complete, apte nu numai să reacţioneze specific cu anticorpii corespunzători, dar şi să stimuleze sinteza lor.

[2] Imunoglobulinele (prescurtat *Ig*) reprezintă totalitatea proteinelor din organism dotate cu activitate de anticorp.

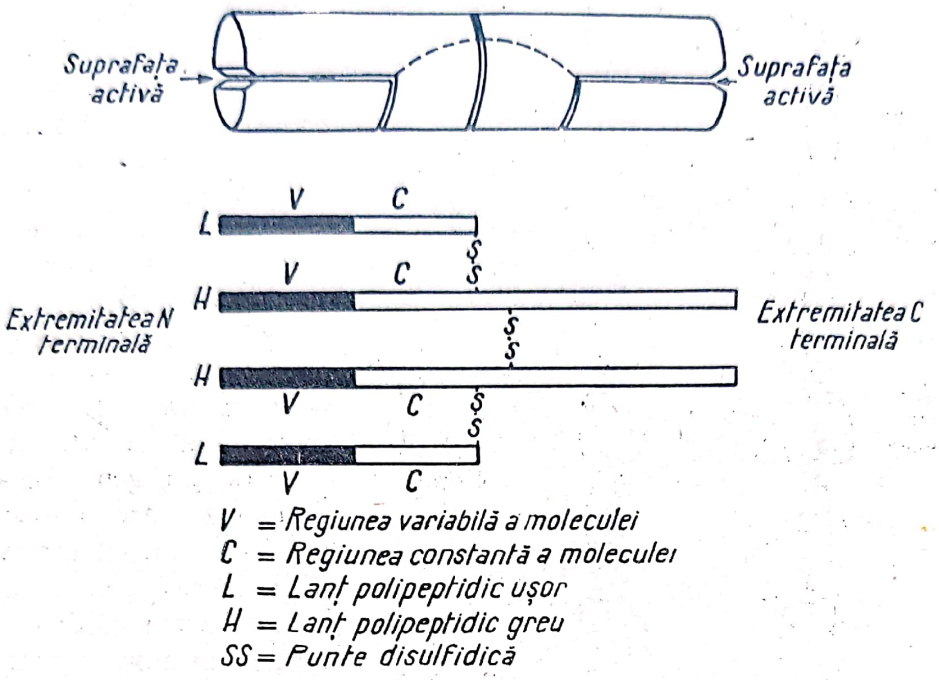


Fig. 386. Modelul de structură al imunoglobulinei (*Ig*) γ G după Edelman și Gally (*sus*). Punțile disulfidice sînt reprezentate prin segmente scurte negre care leagă lanțurile polipeptidice; *jos:* reprezentare schematică a structurii chimice a *Ig G*(γ*G*).

spiralat, astfel că, în ansamblu, molecula anticorp constituie o tetraspirală. După reducerea legăturilor disulfidice, molecula de anticorp se desface în două lanțuri polipeptidice scurte de tip *L* (de la engl. *light*=ușor), cu gr. mol. 20 000, așezate lateral, avînd o structură identică pentru toate cele patru clase de *Ig*, și două lanțuri polipeptidice lungi, de tip *H* (de la engl. *heavy*=greu), cu gr. mol. 50 000 dispuse central, cu structură specifică, datorită compoziției diferite de aminoacizi, care determină proprietățile caracteristice fiecărei clase de *Ig*. Lanțurile sînt legate unul de altul prin intermediul cîte unei singure legături disulfidice. Ele sînt aranjate în așa fel încît molecula anticorp are la fiecare din extremitățile sale cîte o suprafață cu grupări libere susceptibile de a se combina chimic, așa-numita *zonă de combinare* care se poate lega în mod specific cu grupările determinante de specificitate ale unui anumit antigen. Molecula de anticorp este formată din circa 1 400 de aminoacizi, iar zonele sale de combinare corespund la 3—5 aminoacizi. În esență, anticorpii sînt deci proteine serice care au o foarte mare afinitate de combinare cu antigenele naturale sau sintetice.

c. Reacția antigen-anticorp

Anticorpii au specificitate imunologică, în sensul că nu se pot combina decît cu antigenul sub influența căruia s-au format. Arhitectura moleculei de imunoglobulină este perfect adaptată rolului ei de a se „lega" strict specific de

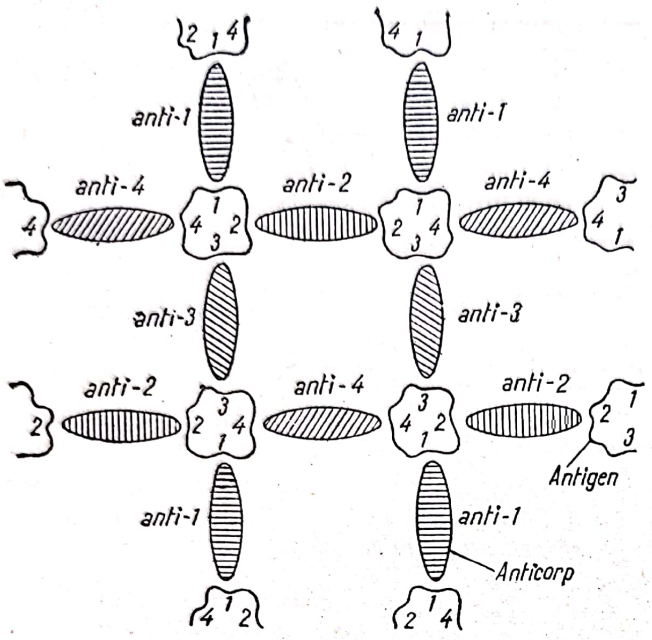


Fig. 387. Reacţia antigen-anticorp: grupările determinante de specificitate ale antigenului (*1—4*) induc sinteza unor tipuri corespunzătoare de anticorpi (anti-1, anti-2 etc.) care participă în reacţia de combinare cu antigenul respectiv (după Davis).

molecula unui anumit antigen. Graţie conformaţiei sale particulare, caracterizată prin prezenţa a două suprafeţe identice de combinare situate la extremităţile opuse ale macromoleculei de imunoglobulină, o moleculă de anticorp se poate combina cu două molecule de antigen, deoarece fiecare din capetele ei „reactive" se leagă de o grupare determinantă de specificitate a cîte unei molecule de antigen. Această particularitate are o mare importanţă pentru eficacitatea apărării imunologice a organismului, deoarece microorganismele conţin un număr mare de determinanţi antigenici identici, accesibili combinării cu anticorpul specific. În felul acesta, în prezenţa anticorpilor o bacterie este legată de un număr mare de alte bacterii similare prin punţi de anticorpi. Multiplicarea punţilor astfel create determină formarea unei „structuri" în formă de tramă reticulată

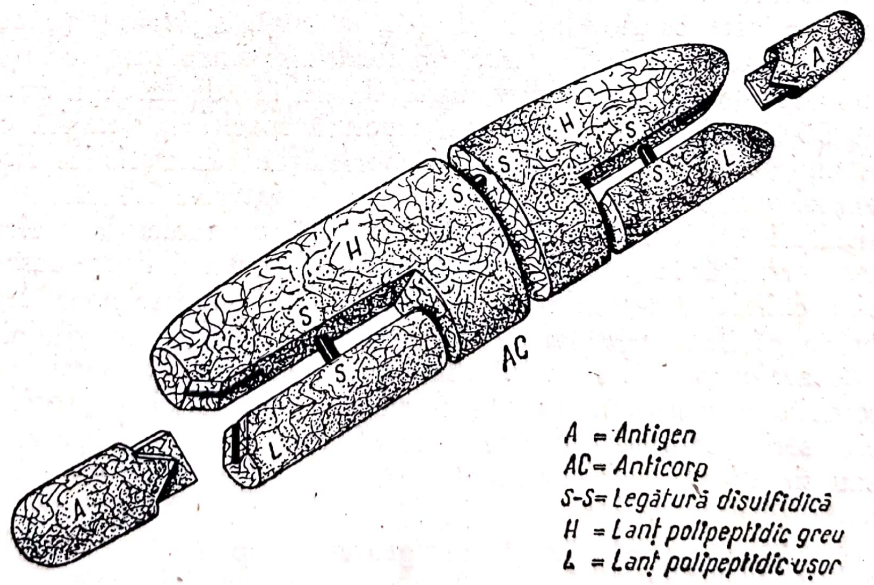


Fig. 388. Model de structură spaţială (tridimensională) a unei molecule de anticorp *7S* evidenţiind cele patru lanţuri polipeptidice, precum şi suprafeţele care permit combinarea specifică cu antigenele corespunzătoare.

de antigene şi anticorpi, în care bacteriile sînt blocate, sensibilizate şi expuse unui contact eficient cu fagocitele.

Nu se cunoaşte la nivel molecular modul de combinare dintre antigen şi anticorp. Se presupune însă că resturile de aminoacizi care formează atît moleculele de anticorp cît şi majoritatea antigenelor au nu numai încărcături negative şi pozitive de forţe diferite, dar şi configuraţii deosebite. Ca urmare, aminoacizii de pe suprafaţa unei molecule proteice conferă suprafeţei respective o distribuţie specifică de sarcini negative şi pozitive. În cazul în care antigenul şi anticorpii au la suprafaţa moleculelor grupări libere care sînt complementare din punctul de vedere al configuraţiei spaţiale şi al încărcăturii electrice, între aceste grupări care constituie suprafeţe reactive se pot forma legături secundare care asigură o combinare specifică solidă a celor două tipuri de molecule. Reacţia antigen-anticorp ar fi deci rezultatul „potrivirii" grupării determinante de specificitate a antigenului cu gruparea reactivă corespunzătoare de pe molecula de anticorp. Această „corespondenţă" poate fi asemănată cu aceea dintre o cheie şi broasca pe care o poate încuia.

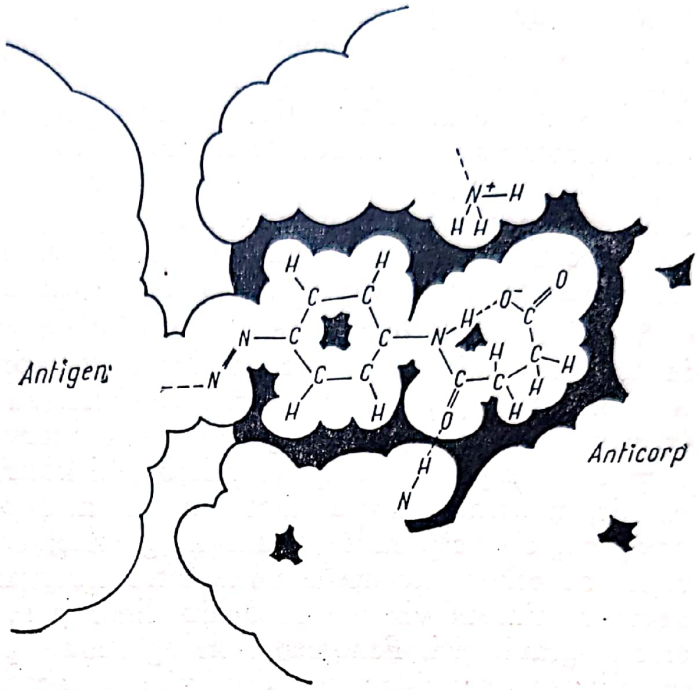


Fig. 389. Schema lui Pauling privind mecanismul reacţiei antigen-anticorp: suprafaţa combinantă a anticorpului are o structură spaţială complementară în raport cu gruparea de specificitate a antigenului.

Producerea într-un sistem *in vitro* a reacţiei antigen-anticorp are efecte, omologe celor survenite *in vivo*, care pot fi evidenţiate calitativ şi evaluate cantitativ în condiţii de laborator şi care sînt cunoscute sub denumirea de reacţii de *precipitare, aglutinare, opsonizare, bacterioliză* etc. Iniţial s-a crezut că fiecare dintre aceste tipuri de reacţie este determinat de un anumit tip de anticorpi denumiţi corespunzător: precipitine, aglutinine, opsonine, bacteriolizine etc. În realitate, acelaşi tip de anticorpi poate provoca oricare dintre efectele enumerate, în funcţie de starea antigenului, care poate fi solubil sau corpuscular, şi de prezenţa anumitor substanţe în mediul de reacţie. Astfel, anticorpii antipolizaharid de pneumococ pot precipita în mod specific polizaharidul corespunzător, pot aglutina celulele bacteriene în prezenţa sărurilor, le pot liza în prezenţa complementului, sau le pot face susceptibile de fagocitoză. Aceste reacţii corespund, prin urmare, nu unor tipuri diferite de anticorpi (deşi vechea terminologie persistă), ci unor consecinţe vizibile diferite ale combinării dintre antigen şi un tip unic de anticorpi.

Reacţia de precipitare urmează combinării anticorpului cu un antigen solubil, un polizaharid sau un compus proteic macromolecular aflate în stare coloidală, şi este rezultatul formării unei reţele tridimensionale de molecule de antigen şi anticorp aşezate alternativ. Macroscopic, această reţea apare ca un precipitat caracteristic la limita de separare dintre lichidele în care erau suspendaţi cei doi reactanţi. Deoarece precipitarea imunologică, denumită şi *floculare*, era strict specifică, ea este folosită în practică pentru titrarea oricărui din cei doi reactanţi, antigenul sau anticorpii, ca şi pentru diagnosticul unor boli infecţioase (de exemplu, *reacţia Ascoli* în cărbune).

Reacţia de aglutinare este o consecinţă a combinării anticorpilor (denumiţi în acest caz „aglutinine") cu antigene de suprafaţă ale corpului microbian — din constituţia peretelui celular, a capsulei sau a cililor — care se traduce prin îngrămădirea laolaltă sau aglutinarea a cîtorva sute de bacterii. Fixarea anticorpilor pe suprafaţa corpilor microbieni determină modificări de ordin fizico-chimic, în urma cărora bacteriile nu mai pot rămîne izolate, în suspensie omogenă, ci încep să se adune în grămezi din ce în ce mai mari, alcătuind reţele de celule bacteriene unite între ele prin punţi de anticorpi, reţele care devin cu timpul vizibile cu ochiul liber şi se depun la fundul eprubetei, sub efectul gravitaţiei. Fenomenul de aglutinare produs în organism nu afectează viabilitatea bacteriilor, dar determină o localizare a agentului patogen — cel puţin temporară — la poarta de intrare.

Reacţia de neutralizare are ca efect inhibarea activităţii biologice a unei substanţe antigenice, spre exemplu, a exotoxinei bacteriene, şi, în consecinţă, anihilarea efectului toxic prin împiedicarea fixării toxinei pe celulele sensibile, ca rezultat al combinării ei cu anticorpii (antitoxine). În cazul neutralizării virusurilor, combinarea cu anticorpi nu distruge particula virală, ci interferă cu procesul de fixarea a virsului pe celula-gazdă sensibilă, blocînd reacţia care determină fixarea ireversibilă a virusului.

Reacţia de opsonizare reprezintă o reacţie de sensibilizare specifică a bacteriilor la fagocitoză, ca rezultat al combinării anticorpilor denumiţi „opsonine" (ceea ce înseamnă în greceşte a aduce alimente, provizii) cu celula bacteriană în prezenţa complementului şi a unor factori termolabili din serul sanguin încă neidentificaţi. Bacteriile sensibilizate specific prin acţiunea opsoninelor sînt mult mai accesibile pentru fagocite. Imobilizarea agentului patogen prin aglutinare şi sensibilizarea lui consecutivă sub acţiunea opsoninelor reprezintă prima fază, premergătoare fagocitozei în procesul de localizare a infecţiei.

Reacţia de bacterioliză, în care antigenul este reprezentat de un număr limitat de specii bacteriene (vibrionul holerei, unii bacili Gram-negativi) se produce ca urmare a unor modificări în structura peretelui celular al bacteriilor Gram-negative antrenînd liza celulei bacteriene şi eliminarea conţinutului ei citoplasmatic în mediu. Reacţia necesită, pe lîngă prezenţa anticorpilor denumiţi *bacteriolizine*, şi pe aceea a unui exces de complement din serul sanguin. Spre exemplu, distrugerea unei celule de *S. typhosa* necesită 700—800 de molecule de anticorpi şi $1{,}5.10^7$ molecule de complement. Spre deosebire de bac-

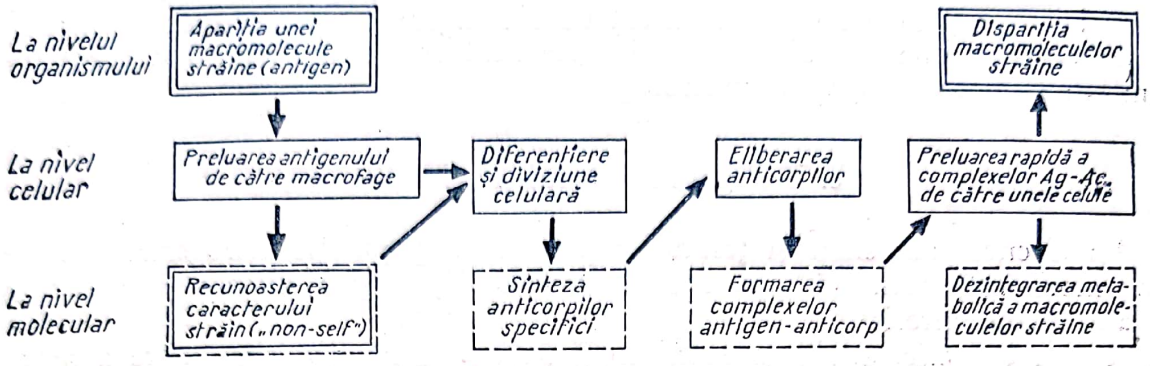


Fig. 390. Reprezentare schematică a principalelor procese legate de răspunsul imunologic consecutiv pătrunderii unui antigen în organism.

teriile Gram -negative care pot suferi liza celulară printr-un proces imun cu caracter specific, speciile Gram-pozitive sînt lizate în special prin mecanisme nespecifice din punct de vedere imunologic, sub acțiunea, de exemplu, a β-lizinei.

Rolul anticorpilor în reacțiile de apărare a organismului față de agenții patogeni infecțioși este demonstrat de o serie de fapte de observație: *1*) anticorpii, față de un anumit agent patogen, sînt totdeauna prezenți în sîngele animalelor imunizate cu agentul patogen respectiv; *2*) serul sangvin al unui astfel de animal, ser care conține anticorpi, este capabil să transmită pasiv imunitatea la un alt animal, la care este injectat; *3*) anticorpii din serul sangvin pot fi îndepărtați complet atunci cînd acesta este pus în contact cu antigenul care le-a determinat apariția, iar după acest proces de adsorbție serul își pierde proprietatea de a transfera pasiv starea de imunitate; *4*) acțiunea anticorpilor este maximă în cazul neutralizării exotoxinelor, care se face direct, ca o reacție chimică, și este comparativ mai mică în cazul celorlalte reacții antigen-anticorp. În reacțiile de imunitate rolul fiziologic esențial al anticorpilor este de a se combina cu antigenul și, o dată cu aceasta, de a-l neutraliza, pentru a-l transporta apoi, lipsit de nocivitate, în vederea eliminării lui din organism.

După G r a b a r și B o y d, funcția de anticorp derivă din funcția originară de transportor pe care o au globulinele în general. Anticorpii, care sînt imunoglobuline, se diferențiază de globulinele normale prin natura substanței pe care o fixează specific pentru a o transporta. Acțiunea anticorpilor nu este însă niciodată suficientă ca atare pentru neutralizarea infecției, proces care este legat de intervenția fagocitelor. Dovada o constituie faptul că la animalele lipsite de fagocite, ca urmare a intoxicației cu benzol, anticorpii nu reușesc să oprească multiplicarea bacteriilor care se adună în mase enorme la poarta de intrare, de unde, neatacate de fagocite, trec în sistemul limfatic, apoi în sînge și în organe, provocînd septicemii mortale.

d. Locul de formare a anticorpilor

Anticorpii sînt sintetizați la nivelul organelor și țesuturilor limfoide; splina și măduva osoasă, în special atunci cînd antigenul este injectat intravenos, ganglionii limfatici regionali, mai ales, după injectarea lui intracutanată, plă-

cile lui Peyer, după absorbţia intestinală a antigenului etc., precum şi în diferite structuri limfoide diseminate şi chiar neoformate, aşa cum sînt granuloamele inflamatorii bogate în macrofage.

e. Rolul limfocitului în imunitate

Limfocitele din sînge şi ţesuturi reprezintă o populaţie eterogenă de celule cu morfologie asemănătoare, dar cu dimensiuni, origine, funcţii şi durată de viaţă foarte diferite.

Limfocitul mic, celulă rotundă cu ∅ 5—8 μ şi cu o valoare mare a raportului nucleu/citoplasmă reprezintă, spre deosebire de limfocitele mijlocii şi mari constituentul celular major al ţesutului limfoid. Acest tip de limfocite, larg răspîndite în tot organismul, este foarte frecvent în special în ganglionii limfatici, splină, timus, ţesuturile limfoide asociate cu tubul digestiv (amigdale, vegetaţii adenoide, apendice, plăcile Peyer), măduva osoasă, sînge, lichidul peritoneal şi canalele limfatice mari.

În raport cu durata lor de viaţă, limfocitele din sînge şi ţesuturi constituie două populaţii diferite. *Limfocitele cu viaţă scurtă*, produse în general de timus şi de măduva osoasă, trec în sînge şi sînt transportate în organe unde dispar rapid, fie că mor, fie că suferă procese de diferenţiere şi proliferare. Semnificaţia lor biologică nu este complet cunoscută. *Limfocitele cu viaţă lungă*, care trăiesc mai multe luni, ani şi unele poate toată viaţa organismului (H a l p e r n), iau naştere în ganglionii limfatici şi în splină, după care intră într-un circuit continuu limfă-sînge-ţesuturi-limfă, oprindu-se de fiecare dată pentru un timp în ţesuturile limfoide prin care trec. Prezenţa lor în număr mare în ganglioni este mai mult rezultatul acumulării lor în cursul acestui circuit decît al producerii locale de celule noi, care este foarte redusă. La origine, limfocitele cu viaţă lungă provin din anumite limfocite timice, care, în urma unui prim contact cu un antigen, contact care are loc cel mai adesea în ganglioni şi în splină, suferă o transformare în sensul acestui tip celular prin intermediul unor modificări apărute în cursul cîtorva mitoze.

G o w a n consideră că din punct de vedere imunologic, limfocitele pot fi caracterizate ca *„angajate"*, *„informate"* sau *„sensibilizate"* *(committed)* atunci cînd s-au aflat în contact cu un antigen specific, sau ca „neinformate", „neangajate" sau „nesensibilizate" *(uncommitted)* atunci cînd nu au avut un astfel de contact şi ca atare sînt libere să răspundă la acţiunea unor stimuli antigenici noi pentru organism. Pe de altă parte, în raport cu capacitatea lor de a reacţiona la prezenţa unui antigen şi de a evolua în sensul transformării în celule producătoare de anticorpi, limfocitele sînt fie *„incompetente"*, înainte de a fi fost expuse la acţiunea unor factori humorali de provenienţă timică şi deci atunci cînd sînt incapabile să reacţioneze cu antigenele, fie *„competente"*, după ce au suferit această expunere graţie căreia pot deveni celule producătoare de anticorpi.

Limfocitul mic este, după majoritatea cercetătorilor, „celula-cheie" a sistemului morfofuncţional de care depinde reactivitatea imunologică a organismului. Stimulată de prezenţa unui antigen, această celulă de tip terminal, deci

incapabilă de diviziune, suferă un proces de derepresie, care se traduce prin activarea unor gene originar împiedicate să se exprime fenotipic şi devine pe această cale capabilă de diferenţiere, în sensul trecerii ei într-o formă structurală nouă, cu potenţialităţi de biosinteză multiple. În cursul acestei transformări, limfocitul suferă o serie de modificări morfobiologice, prin care evoluează mai întîi spre stadiul de *celulă pironinofilă*, similară formei embrionare de limfoblast, capabilă de proliferare prin diviziune şi apoi spre stadiul de *celulă anticorpoformatoare*.

Numai la unele specii animale, dar nu şi la om, limfocitele mici pot să interacţioneze chiar ca atare cu antigenele, iniţiind răspunsul imun primar, iar limfocitele mari pironinofile produc probabil anticorpii 19*S*. Toate răspunsurile imune, fie de tip *umoral* (producere de anticorpi), fie de tip *celular* (reacţiile de hipersensibilitate şi de respingere a grefelor) sînt, prin urmare, mediate de transformarea celulelor limfocide din ganglionii limfatici şi din foliculii limfatici splenici, proces datorită căruia limfocitele devin apte să participe la producerea imunoglobulinelor. Această transformare este reflectată de modificările celulare care survin în ganglionii limfatici regionali după injectarea intracutană a unei substanţe antigenice în teritoriul corespunzător. În mod normal, un astfel de ganglion conţine următoarele tipuri de celule: *1*) limfocite mici, mijlocii şi mari, diseminate în tot ţesutul limfoid, dar cu predominanţa limfocitelor mici la nivelul nodulilor primari ai lui

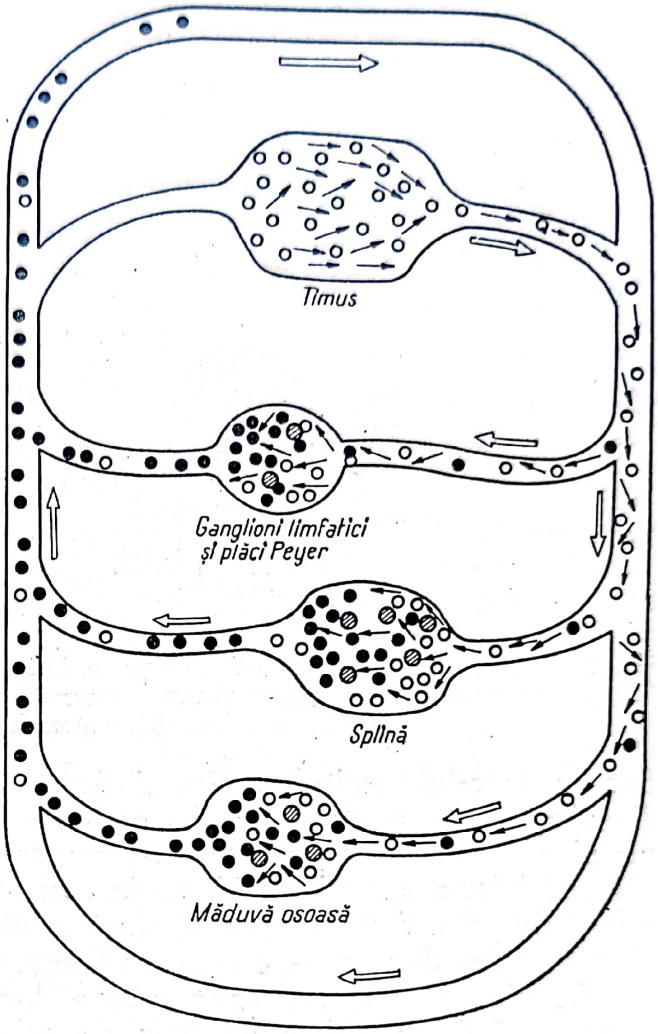


Fig. 391. Modificările funcţionale ale limfocitelor sub influenţa timusului. La naştere, cele mai multe limfocite (○) se găsesc în timus şi numai puţine în alte organe limfoide asociate cu celule cap de serie (◍). Limfocitele timice (○) sînt „incompetente", adică incapabile să reacţioneze cu antigenele, atîta timp cît nu au fost expuse acţiunii unui factor umoral timic (→). Trecînd în sînge, factorul timic ajunge în ţesuturile limfatice unde stimulează producerea de limfocite „competente" (●) care pot deveni celule anticorpoformatoare şi induce proliferarea celulelor cap de serie (◍) cu diferenţierea lor în limfocite „competente" (după Levey).

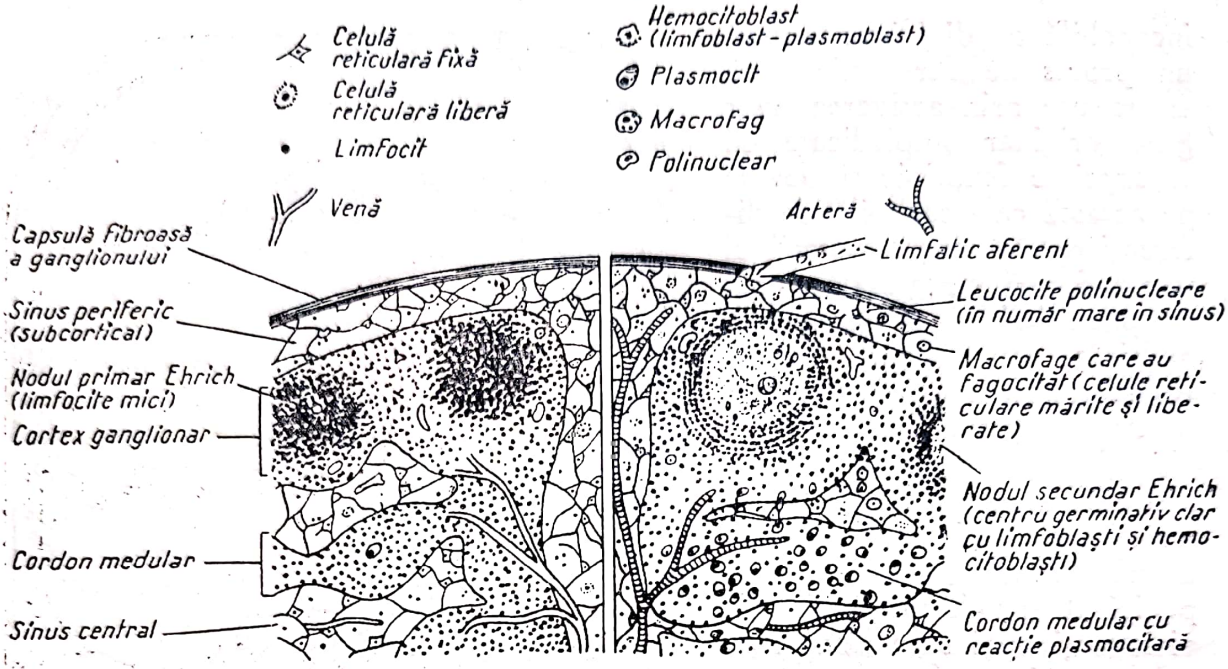


Fig. 392. Structura unui ganglion limfatic înainte *(stînga)* şi după contactul cu antigenul *(dreapta)*. Se observă diferenţe evidente legate în special de apariţia nodulilor secundari Ehrich şi a reacţiei plasmocitare (după Voisin).

Ehrich; 2) celule reticulare fixe şi libere, adesea cu proprietăţi macrofagiee diseminate, dar predominînd în sinusuri; *3)* rare plasmocite şi rare celule pironinofile; *4)* foarte rare polimorfonucleare în sinusuri.

După injectarea antigenului, acesta este localizat în macrofage (celule reticulare fixe din sinusuri capabile după aceea să-şi mărească volumul şi să se libereze), care după ce l-au înglobat îl supun unui proces de digestie în vacuole. Ulterior, ele cedează acest antigen degradat limfocitelor mici, care s-au grupat în jurul lor stimulînd astfel evoluţia acestor limfocite spre stadiul de celule anticorpoformatoare (N o s s a l şi A b b o t, 1966). Aceste modificări sînt însoţite de acumularea unui exsudat inflamator conţinînd leucocite polimorfonucleare.

În cazul injectării intravenoase a antigenelor, faza precoce de degradare a acestora, premergătoare sintezei de anticorpi, este realizată de celulele sinusale şi reticulare din splină, din ganglionii limfatici şi din măduva osoasă, de celulele Kupffer şi macrofagele „călătoare" din ţesuturi, care localizează antigenele, captîndu-le prin ingestie şi le „prepară" în vederea răspunsului imun, degradîndu-le la fragmente-antigene difuzibile. Modificarea cea mai caracteristică este reprezentată însă de formarea în ganglioni a „centrilor clari", numiţi „centri de reacţie" („germinativi"), caracterizaţi prin prezenţa celulelor mari bazofile pironinofile şi apariţia ulterioară a unei coroane compacte de limfocite mici. Ansamblul acestor celule formează în cortexul ganglionar nodulii secundari ai lui Ehrich. Concomitent, în zona medulară a ganglionilor apar plasmocitele şi precursorii lor, celulele bazofile pironinofile bogate în ARN, ribozomi şi reticul endoplasmic, ceea ce sugerează că aceste celule fac biosinteze de proteine. Apariţia asociată a nodulilor secundari ai lui Ehrich

şi a celulelor plasmatice este caracteristică pentru faza de biosinteză a anticorpilor.

Producerea anticorpilor în celulele plasmatice. Aşa cum arată rezultatele cercetărilor moderne, celula plasmatică sau plasmocitul reprezintă principala, dacă nu chiar unica, celulă producătoare de anticorpi. După injectarea unui antigen, la locul injecţiei apar în cîteva zile numeroase celule plasmatice imature — plasmablaşti — ca urmare a unor procese de proliferare şi de diferenţiere a limfocitului mic. Plasmablaştii, care persistă puţin timp, produc numai cantităţi mici de anticorpi. Ei se divid însă, dînd naştere unor celule progene diferite morfologic de celulele parentale: fiecare ciclu de diviziune succesivă are ca rezultat formarea unor celule cu citoplasma progresiv îmbogăţită în ribosomi. După aproximativ opt generaţii de celule, adică la 5 zile de la injectarea antigenului, apar celulele plasmatice adulte care liberează cantităţi masive de anticorpi.

Aşadar, introducerea unui antigen în sînge determină două efecte succesive, diferite ca specificitate: mai întîi, simpla apariţie a plasmablaştilor şi transformarea lor ulterioară în celule mature bogate în ribozomi şi capabile să facă rapid sinteza unor cantităţi importante de proteine-anticorp, iar apoi un proces cu caracter specific constînd din sinteza unui anumit tip de ARN_m, capabil să codifice secvenţele de aminoacizi proprii moleculelor de anticorp, specific faţă de antigenul injectat.

Experienţele lui Nossal efectuate pe culturi de celule plasmatice izolate au arătat că fiecare celulă, cu foarte rare excepţii, produce un singur tip de anticorp, funcţionînd prin urmare ca un dispozitv de biosinteză specific, ale cărui capacităţi de sinteză proteică sînt dirijate în sensul elaborării unui singur produs, chiar şi atunci cînd unele celule învecinate sintetizează alte tipuri de anticorpi. Există deci în procesul de anticorpogeneză o veritabilă „diviziune a muncii", după principiul o celulă — un anticorp (Nossal, 1967).

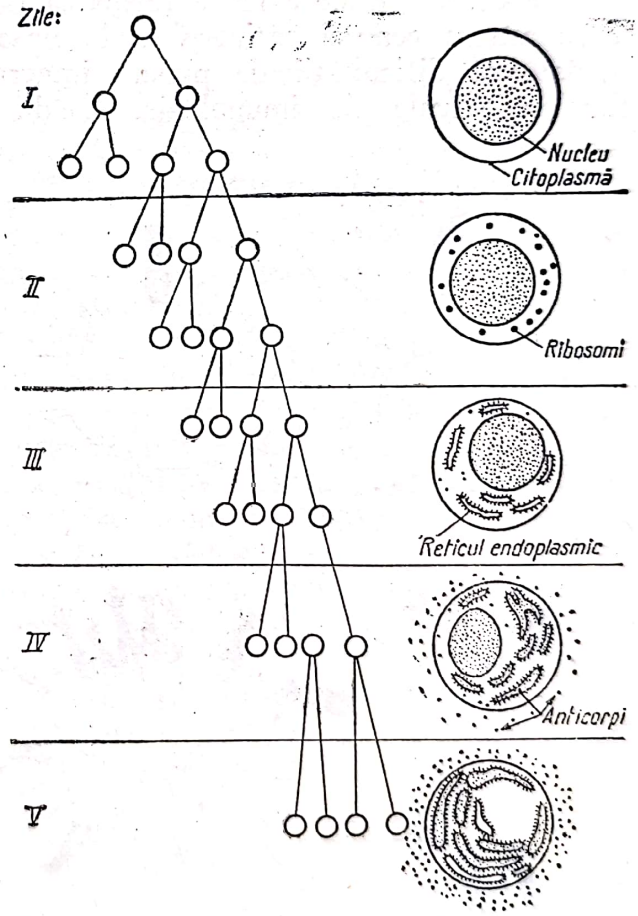


Fig. 393. Etapele succesive ale dezvoltării unei celule plasmatice mature. Apariţia celulelor capabile să producă intens anticorpi necesită cel puţin 8 generaţii de celule şi 5 zile de creştere. Particularitatea esenţială a celulelor mature este dezvoltarea intensă a reticulului endoplasmic ale cărui cavităţi sînt pline cu molecule de anticorpi (după Nossal).

f. Ipoteze asupra modului de formare a anticorpilor

Prima încercare de a explica modul de formare a anticorpilor a fost teoria catenelor laterale a lui Ehrlich (1900). Conform acestei teorii, într-o primă etapă, antigenul, de exemplu o toxină bacteriană, ar ataca celulele sensibile, fixîndu-se, pe bază de afinitate chimică, la nivelul unora dintre receptorii celulari de forma unor catene laterale, care în mod normal ar avea rolul de a lega specific anumiţi compuşi nutritivi, de unde şi denumirea de *nutroceptori* dată catenelor laterale. Pentru a supravieţui blocării unor receptori celulari de către antigenul care are afinitate chimică pentru ei, celula atacată ar reacţiona sintetizînd în exces tipul de proteină corespunzător catenelor laterale blocate. Eliberate în sînge, aceste substanţe proteice ar reprezenta anticorpii caracterizaţi printr-o afinitate specifică de combinare cu antigenul a cărui acţiune a indus formarea lor. Ulterior, s-au elaborat mai multe teorii asupra genezei anticorpilor în lipsa unor dovezi experimentale directe şi datorită dificultăţii de punere integrală în acord cu totalitatea cunoştinţelor actuale de imunologie. Lederberg (1959) a împărţit aceste concepţii în două categorii principale:

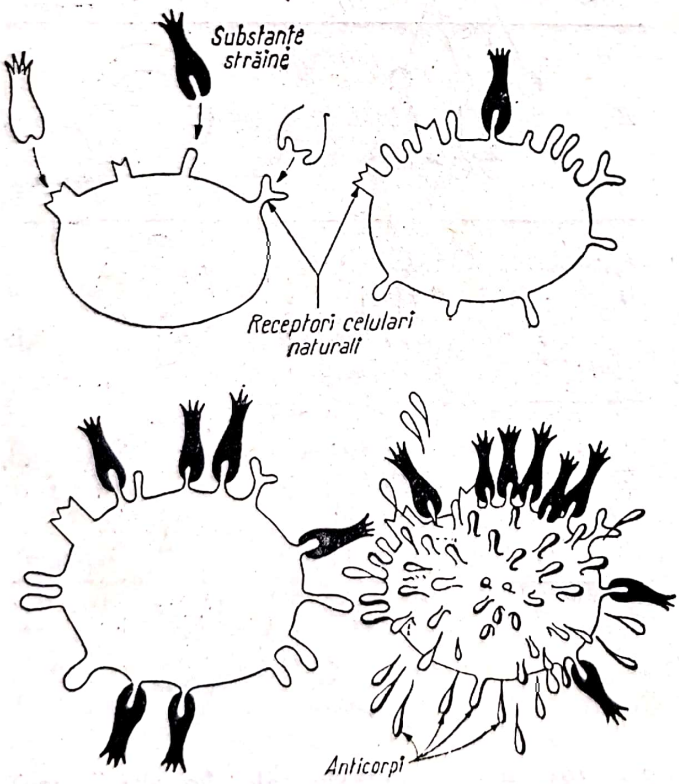


Fig. 394. Etapele formării anticorpilor după teoria selectivă a lui Ehrlich. Prezenţa substanţelor străine şi combinarea lor cu receptorii celulari naturali au drept urmare multiplicarea acestor receptori şi eliberarea lor ca anticorpi înzestraţi cu posibilitatea de a se lega specific de substanţele respective (după Davis).

1) *Teoriile „instructive"*, conform cărora moleculele de anticorpi sînt sintetizate *de novo* sub acţiunea specifică a antigenului, care, pătrunzînd în celula anticorpoformatoare, determină la acest nivel modificări, fie ale proteinelor în curs de sinteză, fie ale acizilor nucleici; în urma unor asemenea modificări, aminoacizii constitutivi ai globulinelor sintetizate de această celulă sînt aranjaţi în aşa fel încît se formează molecule de imunoglobuline, diferite de cele normale şi capabile să reacţioneze specific cu antigenul dat.

2) *Teoriile „selective"*, după care moleculele de imunoglobulină s-ar găsi preformate în anumite celule, antigenul acţionînd doar ca un factor de selecţie prin aceea că, pătrunzînd sau fixîndu-se efectiv numai la nivelul acelor celule care conţin proteinele-anticorpi capabile prin structura lor chimică să reacţioneze specific cu

el, stimulează reproducerea accelerată a acestor celule însoţită, fireşte, de elaborarea unei mari cantităţi din anticorpul respectiv.

Teoria catenelor laterale a lui Ehrlich reprezintă prima concepţie de acest tip, deoarece ea postulează acţiunea selectivă a antigenului asupra unor proteine preformate, reprezentînd anticorpi specifici potenţiali, acţiune exercitată prin stimularea specifică a sintezei în exces a unui anumit tip de proteină în celulele care poartă asemenea catene laterale proteice cu specificităţi diferite de combinare cu diverse antigene.

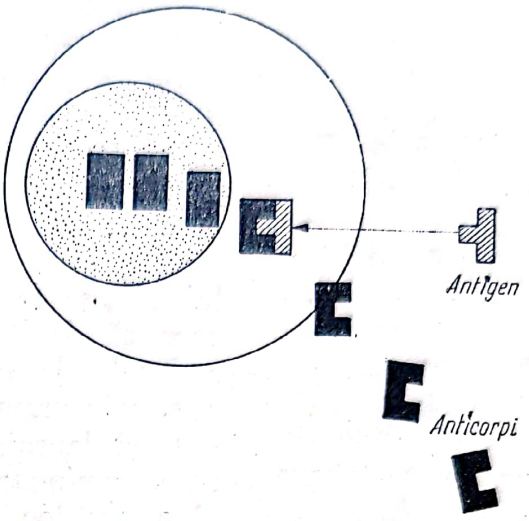


Fig. 395. Reprezentare schematică a modului de formare a anticorpilor după teoria instructivă clasică. Antigenul pătrunde în plasmocit şi acţionează ca model pentru formarea anticorpilor cu configuraţie complementară aceleia a antigenului.

Teoriile instructive. Ipotezele lui Breinl, Haurowitz (1930), Alexander (1931), Mudd (1939), Pauling (1940) diferă între ele prin unele detalii dar au în comun ideea de bază că în celulele producătoare de globuline normale ar exista o moleculă specială cu rol de „model", care ar funcţiona ca un adevărat „tipar" sau „matriţă" pentru sinteza moleculelor de globuline. În urma pătrunderii unui antigen în aceste celule, configuraţia „tiparului" molecular de sinteză globulinică s-ar modifica sub acţiunea forţelor polare ale grupărilor determinante de specificitate ale antigenului. În consecinţă, γ-globulinele care se vor forma în acest caz, imunoglobulinele sau anticorpii, vor avea o structură chimică omologă structurii primare a proteinei care constituie γ-globulina normală a speciei animale respective. Ele vor fi însă „deformate" în ceea ce priveşte structura lor secundară, în aşa fel încît anumite zone de la suprafaţă moleculei lor vor avea o configuraţie spaţială complementară aceleia a unor zone de la suprafaţa moleculei de antigen. De aici ar rezulta „potrivirea" perfectă şi combinarea strînsă dintre aceste zone superficiale ale moleculei de anticorp şi grupările determinante de specificitate ale antigenului care a modificat configuraţia spaţială a „matriţei moleculare" de sinteză a globulinei.

Ipoteza cea mai cunoscută din acest grup de concepţii „instructive" este aceea a lui Pauling şi Haurowitz, care este denumită *teoria „template"*-ului sau a *„matriţei directe"*, deoarece sinteza anticorpului este prezumată a fi efectuată direct după tiparul oferit de gruparea determinantă de specificitate a antigenului pătruns în celula formatoare de anticorpi (Haurowitz, 1952). Aceşti autori presupun deci că structura moleculară primară a tuturor anticorpilor ar fi asemănătoare, pentru că secvenţa aminoacizilor din proteina lor ar fi aceeaşi. Deosebirea esenţială dintre anticorpii diferiţi ca specificitate ar rezida numai în conformaţia tridimensională a moleculei lor, adică în structura secundară a proteinei constitutive, rezultînd din plierea

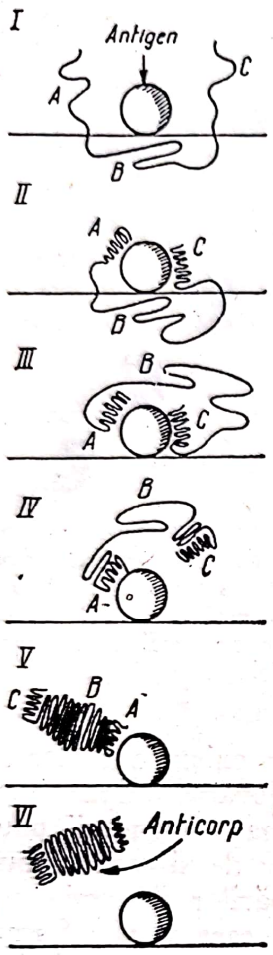


Fig. 396. Formarea anticorpilor după ipoteza lui Pauling. Sînt prezentate şase etape succesive ale procesului în care antigenul acţionează asupra unei γ-globuline pe cale de formare *(A-B-C)*, determinînd o anumită aşezare spaţială, în aşa fel încît extremităţile ei iau o formă complementară grupărilor de specificitate ale antigenului.

sau aranjarea spaţială diferită a unor lanţuri polipeptidice chimic identice. Antigenul ar determina natura specifică a anticorpului în curs de formare, combinîndu-se cu lanţul de globulină nou-sintetizat, înainte ca acesta să se dispună în configuraţia spaţială caracteristică. Interacţiunea dintre antigen şi acest lanţ ar determina aranjarea unei părţi a moleculei de anticorp în jurul grupării determinante de specificitate a antigenului, în aşa fel încît această parte a moleculei de anticorp să devină complementară faţă de porţiunea din molecula de antigen după care s-a pliat. Specificitatea este, prin urmare, conferită anticorpilor nu în momentul sintezei lanţului lor polipeptidic, adică la secvenţializarea aminoacizilor, ci într-un stadiu ulterior, atunci cînd are loc replierea acestui lanţ cu formarea unei anumite configuraţii spaţiale. Într-o ultimă fază a sintezei de imunoglobuline se stabilesc legăturile „în punte", care menţin replierea caracteristică unei anumite molecule de anticorp, conferind acestei molecule stabilitatea şi specificitatea ei în raport cu antigenul care i-a imprimat configuraţia.

Pînă în prezent nu există însă probe care se ateste că o moleculă de proteină, cum este antigenul, ar putea acţiona ca model pentru sinteza altei molecule de proteină. De aceea, unii autori consideră că antigenul nu ar constitui ca atare modelul moleculei de anticorp, ci că el ar putea acţiona numai prin intermediul ARN sau ADN, la nivelul cărora ar fi în prealabil transferat, deoarece numai un acid nucleic poate furniza celulei un anumit model de sinteză proteică. În plus, ipoteza „matriţei directe" este în dezacord şi cu datele rezultate din analiza secvenţei aminoacizilor la diferite tipuri de anticorpi, întrucît aceasta arată că anticorpii nu sînt identici nici în ceea ce priveşte structura lor primară. Într-adevăr, orice moleculă de anticorp este alcătuită din două regiuni distincte: una cu structură comună tuturor anticorpilor, ceea ce dă impresia identităţii lor sub raportul structurii primare, şi alta în care secvenţa aminoacizilor, deci chiar structura primară a moleculei, diferă de la un anticorp la altul.

Pentru a elimina unele dintre neajunsurile teoriei „matriţei directe", Burnet şi Fenner (1949) au elaborat *teoria „matriţei indirecte"*. După această concepţie, antigenul ar acţiona în biosinteza proteinelor-anticorp nu în mod direct, ci prin intermediul unei alterări a enzimelor endocelulare participante la acest proces. Această alterare a enzimelor ar fi determinată de pătrunderea

antigenului în nucleu, unde s-ar forma o „genocopie" a grupării lui determinante de specificitate. În felul acesta, celulele formatoare de anticorpi ar putea rămîne active toată viaţa, ca depozitare ale funcţiei de „memorie imunologică".

Teoriile selective. După teoria selectivă a *catenelor laterale* emisă de Ehrlich (1900), prima reluare într-o formă nouă a acestei concepţii este *teoria selecţiei naturale* a lui Jerne (1955), după care în circulaţie ar exista în mod normal un număr foarte mare de γ-globuline diferite, cu grupările reactive (suprafeţele combinante) cele mai variate, furnizînd astfel numeroase posibilităţi de combinare cu practic orice fel de antigen. O dată pătruns în organism, antigenul ar fixa selectiv anticorpul corespunzător lui, care, împreună cu ceilalţi anticorpi, circulă spontan, în mod liber în organism, şi l-ar trans-

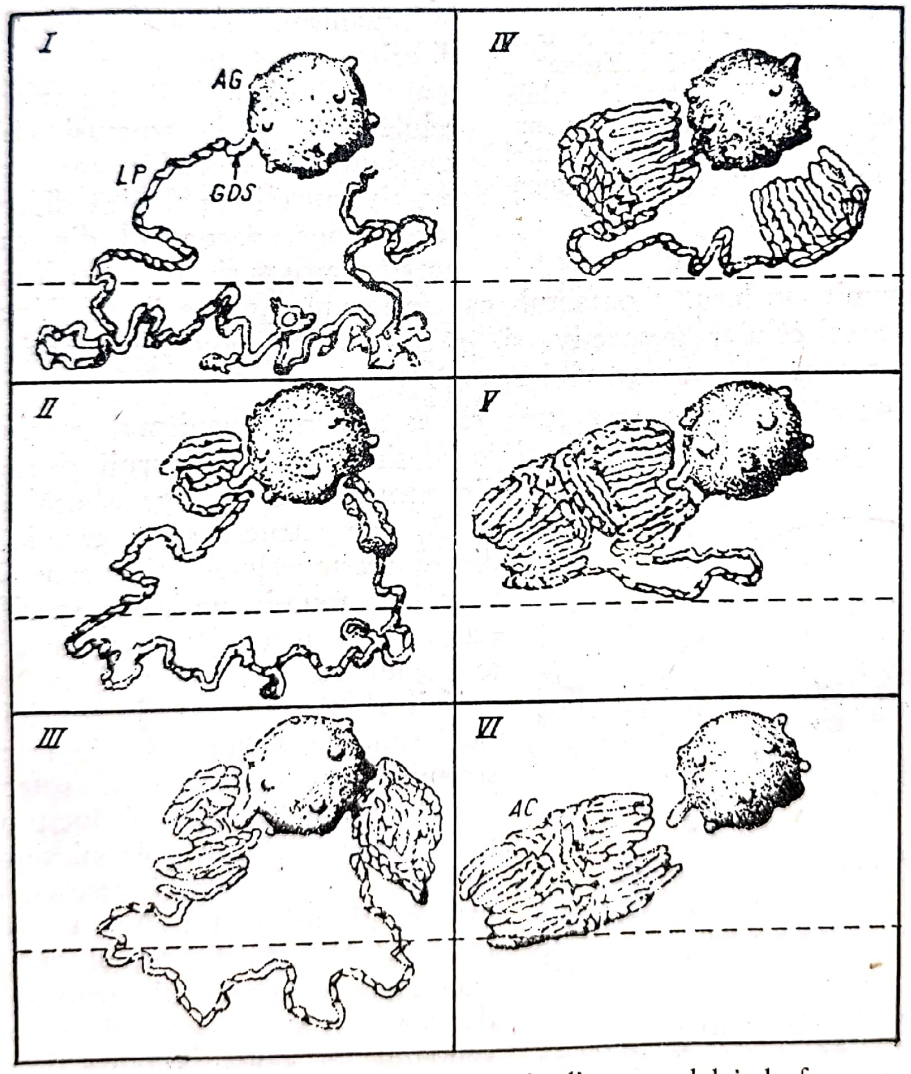


Fig. 397. Reprezentare diagramatică de detaliu, a modului de formare a anticorpilor după ipoteza Marrack-Pauling: lanţul polipeptidic de bază *(LP)* capătă o configuraţie spaţială corespunzătoare „modelului" sau „tiparului" reprezentat de grupările determinante de specificitate *(GDS)* ale antigenului *(AG)*.

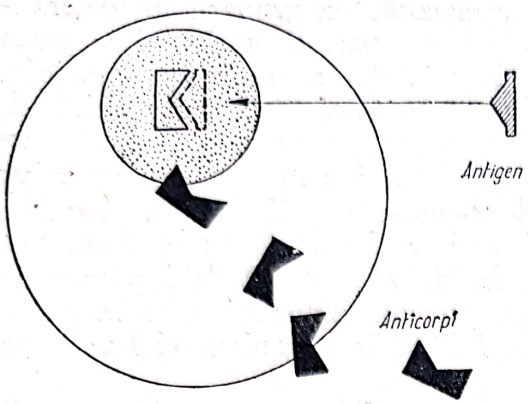


Fig. 398. Mecanismul de formare a anticorpilor după teoria „matriţei indirecte" a lui Burnet. Antigenul pătruns în celula formatoare de anticorpi introduce în nucleu propria lui „imagine", inducînd astfel posibilitatea sintezei anticorpului corespunzător.

porta pînă la sistemul de celule capabile să facă după acest anticorp „replici" sau reproduceri exacte, care sînt apoi liberate în sînge, de unde creşterea concentraţiei sanguine a anticorpului astfel selecţionat sub acţiunea specifică a antigenului.

Teoria selecţiei clonale a lui Burnet (1957) înlocuieşte ipoteza prezenţei în sînge a unor anticorpi naturali foarte diferiţi, practic, de toate tipurile posibile, cu aceea a existenţei în organismul normal a unor populaţii diferite — *clone* — de celule formatoare de anticorpi. Pe suprafaţa acestor celule s-ar găsi structuri chimice cu configuraţie specială, care determină reactivitatea imunologică diferită a fiecărei clone, decurgînd din capacitatea acestor structuri de a se lega specific cu un anumit antigen. Contactul cu antigenul provoacă proliferarea mai rapidă a clonei celulare respective şi, în consecinţă, producerea masivă a anticorpului corespunzător antigenului legat.

Teoria selecţiei clonale presupune că la naştere organismul conţine deja o celulă sau un grup de celule capabile să sintetizeze anticorpii pentru fiecare din nenumăratele antigene străine posibile şi că, prin structura sa genetică, fiecare dintre aceste celule „ştie" cum să sintetizeze un anumit anticorp specific, chiar dacă nu a fost niciodată în contact cu antigenul corespunzător. Acest lucru este posibil, după Burnet, datorită faptului că în stadiile precoce ale vieţii embrionare strămoşii acestor celule au suferit numeroase mutaţii, în aşa fel încît materialul lor genetic, care controla biosinteza anticorpilor, s-a modificat frecvent în mod spontan şi întîmplător. Fiecare celulă mutantă a devenit, la rîndul ei, strămoşul unei clone celulare noi, grup sau familie de celule identice între ele şi purtînd în genomul lor potenţialitatea de a fabrica un anumit tip de anticorp. În această perioadă, datorită caracterului întîmplător al mutaţiilor, apar, desigur, şi celule care vor forma anticorpi faţă de antigenele

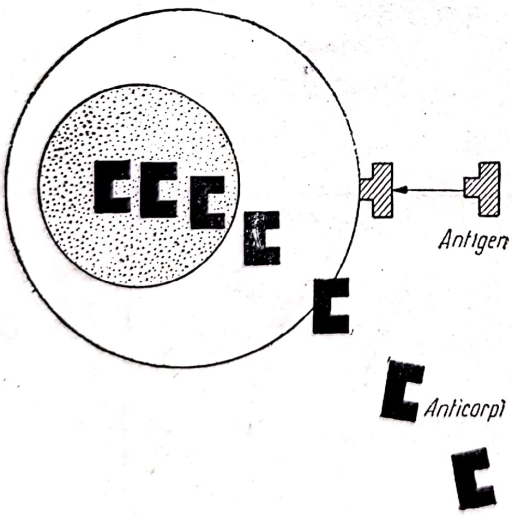


Fig. 399. Modul de formare a anticorpilor după teoria selecţiei clonale (după Nossal). Antigenul intră în contact cu acele plasmocite care pot elabora anticorpii corespunzători lui şi induce iniţierea de către ADN celular a biosinteezi anticorpilor.

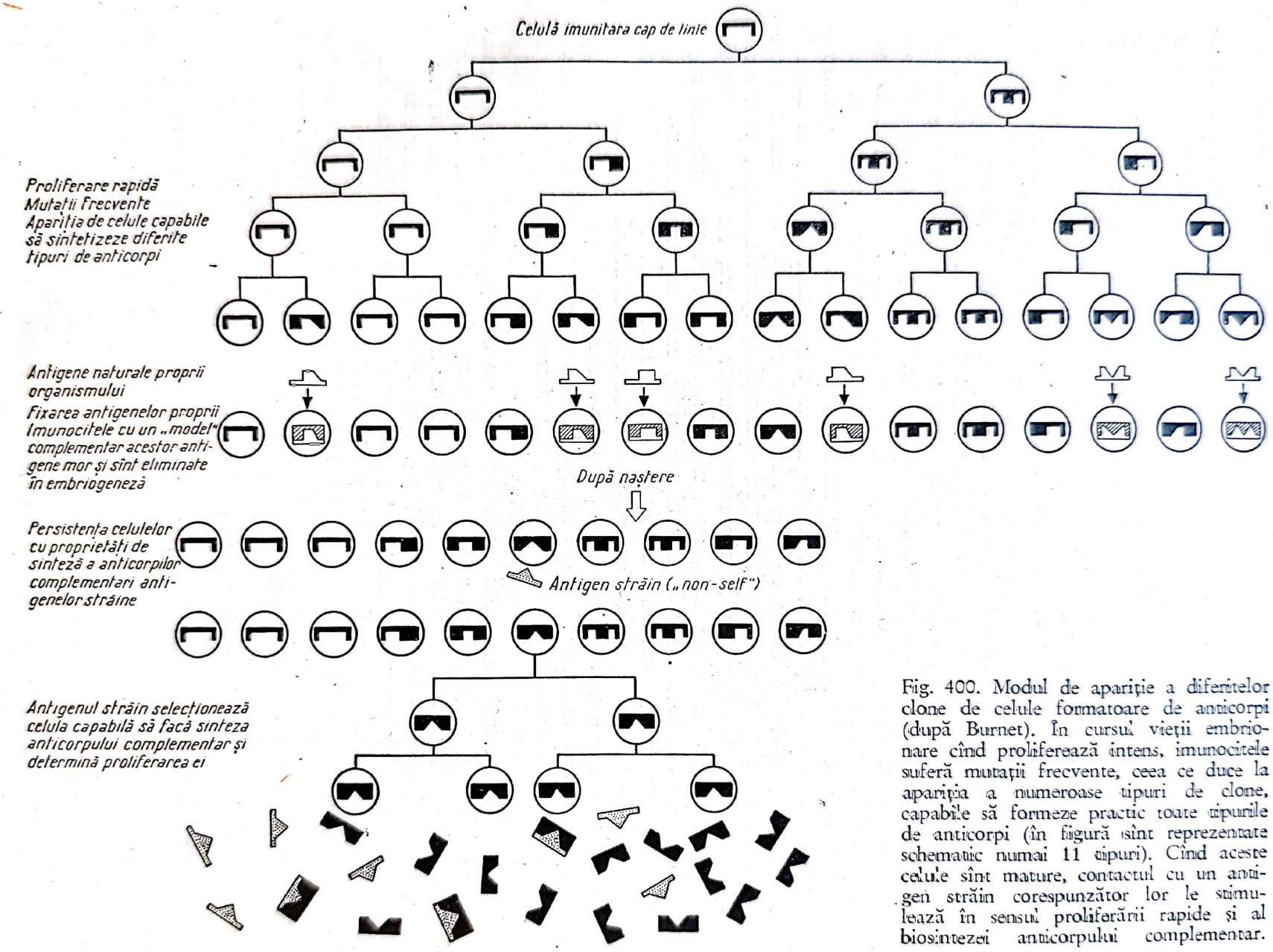


Fig. 400. Modul de apariție a diferitelor clone de celule formatoare de anticorpi (după Burnet). În cursul vieții embrionare cînd proliferează intens, imunocitele suferă mutații frecvente, ceea ce duce la apariția a numeroase tipuri de clone, capabile să formeze practic toate tipurile de anticorpi (în figură sînt reprezentate schematic numai 11 tipuri). Cînd aceste celule sînt mature, contactul cu un antigen străin corespunzător lor le stimulează în sensul proliferării rapide și al biosintezei anticorpului complementar.

Scanned with OKEN Scanner

reprezentate de proteinele proprii organismului respectiv. Întrucît însă organismul nu trebuie să producă anticorpi față de proprii săi constituenți, se presupune că asemenea mutante nedorite sau „interzise" sînt distruse și eliminate după contactul cu proteinele proprii. Deoarece antigenele străine *(non-self)* nu pot pătrunde în embrion, celulele capabile de a sintetiza anticorpii corespunzători acestor antigene rămîn și se dezvoltă în continuare. Spre sfîrșitul vieții embrionare viteza de apariție a mutațiilor scade pînă la frecvența redusă cu care acestea se mai produc în organism și după naștere. Clonele „interzise" care continuă să apară, deși cu o frecvență joasă, sînt inhibate sau omorîte înainte de a ajunge la maturitate din punct de vedere imunologic. În schimb, celulele care pot deveni imunologic mature nu mai sînt distruse în urma contactului cu antigenul *non-self* corespunzător, ci sînt stimulate de prezența acestuia în sensul proliferării lor sub formă de plasmocite, care fabrică anticorpi capabili să se combine cu antigenul străin respectiv și să-l inactiveze.

Atunci cînd un antigen pătrunde în organism, el are prin urmare proprietatea de a *selecționa*, dintre toate clonele de celule potențial anticorpoformatoare, pe aceea capabilă să sintetizeze anticorpul specific lui, de a se atașa la suprafața acestor celule și de a le stimula intens proliferarea, ceea ce determină creșterea rapidă a concentrației anticorpilor specifici. Acest proces este posibil datorită prezenței la suprafața celulelor mature, fie a unei cantități mici din propriul lor anticorp, fie a unor grupări chimice cu configurație specială, diferită pentru fiecare familie de celule, care le permite să reacționeze imunologic prin combinare cu antigenul corespunzător. Așadar, informația străină pe care o reprezintă antigenul nu pătrunde ea însăși în imunocit [1], ci, localizată la suprafața acestor celule, nu are decît rolul de a induce declanșarea sintezei moleculelor de anticorpi, proces care se realizează în același mod ca și sinteza oricărei proteine, adică potrivit informației genetice codificate în genomul celulei producătoare.

Pe linia aceleiași concepții „selective" în ceea ce privește modul de formare a anticorpilor, Lederberg (1959) propune ipoteza controlului genetic al sintezei anticorpilor, după care celula apătă de a forma un anumit tip de anticorpi ar avea în structura ADN o secvență specifică de nucleotide, echivalînd morfologic cu o anumită genă din materialul ei genetic. Sinteza fiecărui tip de anticorpi ar fi deci dependentă de o genă cu structură specifică. Celulele formatoare de anticorpi ar fi deci genetic diferite. Această diversitate genetică ar fi determinată de marea frecvență a mutațiilor spontane, survenite în cursul proliferării în embriogeneză.

g. Rolul timusului în imunogeneză

Mecanismul prin care timusul influențează imunogeneza nu este exact cunoscut (J. E. A. P. Miller, 1967), dar el este în mod neîndoielnic legat de rolul său în dezvoltarea sistemului limfoid și de funcțiile principalelor celule

[1] *Limfocitele*, celulele plasmatice și elementele SRE, împreună cu celulele timice de origine, formează *complexul imunocitelor* — celule cu rol în procesele de imunitate. Unii autori denumesc celulele de origine *imunoblaste*, iar pe cele mature — *imunocite*.

ale acestui ţesut, *limfocitele*. Proba directă cea mai importantă a rolului acestui organ în imunogeneză a fost obţinută prin ablaţia lui (extirparea chirurgicală) la unele animale şi în special la şoarece, efectuată imediat după naştere. După ce cîteva săptămîni s-au menţinut în stare aparent normală, animalele private de timus fac o boală caracteristică, o caşexie progresivă, denumită *wasting disease:* ele scad în greutate şi prezintă o stare generală alterată, cu somnolenţă, diaree cronică, aplazia sistemului limfoid, scăderea numărului de limfocite şi lipsa reacţiilor imunologice humorale, fenomene care pot fi prevenite prin grefa de timus omolog.

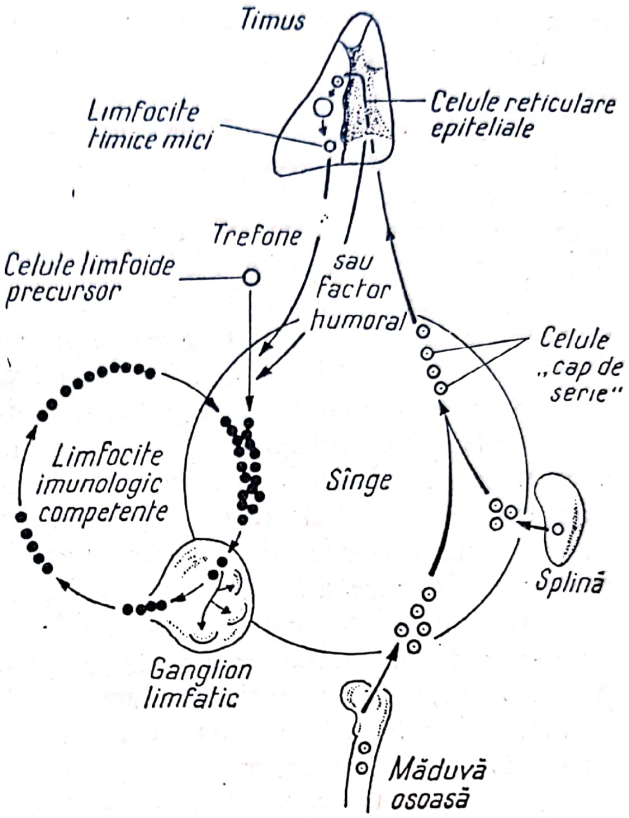


Fig. 401. Reprezentare schematică a funcţiei timusului în imunogeneză. Celulele limfoide precursor se diferenţiază spre stadiul de celule imunologic „competente" sub influenţa unui factor de origină timică, produs fie sub formă de trefone de către limfocitele timice, fie ca o substanţă humorală elaborată de celulele reticulare epiteliale (după J. F. A. P. Miller).

Timusul este primul organ în care apar limfocite în cursul embriogenezei. Din momentul apariţiei lor, deci deja de la naşterea organismului, limfocitele timice *(timocitele)* sînt capabile de multiplicare intensă. Proliferarea lor este determinată de un stimul intrinsec, constînd din produsele citoreticulului epitelial timic, care le face în acelaşi timp capabile să reacţioneze cu antigenele, adică să se comporte ca celule imunologic *competente*. Limfopoieza timică intensivă, însoţită de frecvente variaţii genetice întîmplătoare, survenind în cursul mitozelor, reprezintă mecanismul prin care se realizează diversificarea potenţialului de reactivitate al celulelor limfoide. În această perioadă, adică la naştere, splina, ganglionii limfatici şi alte organe limfoide conţin numai o mică rezervă de limfocite şi, alături de acestea, unele celule-precursori cu potenţiale multiple de evoluţie (celule-mamă sau „stem cell") dar incapabile de multiplicare şi areactive în prezenţa unui antigen, fiind deci *incompetente* din punct de vedere imunologic. Apariţia celulelor cu rol în imunitate s-ar putea realiza pe două căi:

1) După un anumit timp de la naştere, variabil în funcţie de specie, limfocitele timice ar migra în sînge şi ar ajunge pe această cale la nivelul ţesuturilor limfoide extratimice (splină, ganglioni limfatici) unde s-ar opri şi, suferind un proces de maturare, ar evolua ca o populaţie de celule capabile să îndeplinească funcţii imunologice. La nivelul acestor organe, limfocitele se întîlnesc

cu antigenele, reacţionează cu ele şi devin „angajate" sub raport imunologic. Ele încep să se multiplice şi dau naştere la *celule plasmatice,* care formează anticorpi.

2) După alţi autori, timusul ar acţiona pe cale hormonală asupra multiplicării limfocitelor periferice extratimice, reglînd totodată şi activitatea lor imunologică. Această acţiune s-ar exercita prin intermediul a doi factori, care permit diferenţierea ca celule competente a unor precursori celulari insensibili la antigene: *„factorul care stimulează limfocitoza"* (*LSF=lymphocytosis stimulating factor* al lui Metcalf) şi *„factorul care induce competenţa imunologică a limfocitelor"* (*CIF=competence inducing factor,* al lui Miller). După Miller, *LSF* şi *CIF* ar fi în realitate unul şi acelaşi factor care, prin analogie cu *eritropoietina,* ar putea fi numit *limfopoietina.*

Sub influenţa limfopoietinei, celulele limfoide normale, precursori insensibili la antigene ai limfocitelor, ar trece într-o fază de proliferare, suferind concomitent un proces de diferenţiere progresivă în urma căruia ar apărea numeroase celule progene, dintre care unele ar deveni sensibile la antigene. Din momentul în care au suferit această evoluţie, limfocitele fac parte din stocul circulant de celule, care de această dată sînt insensibile la acţiunea limfopoietinei, fiind celule terminale incapabile de multiplicare. În schimb, la prezenţa unui stimul antigenic, aceste celule „competente" răspund prin transformarea lor în celule capabile de a prolifera şi de a se diferenţia ca celule producătoare de anticorpi.

Good[1] consideră că timusul ar fi organul iniţiator al sistemului limfocid şi că, după naştere, el ar transfera o bună parte din funcţiile sale sistemului limfoid al tubului digestiv (bursa lui Fabricius la păsări, amigdalele, apendicele şi plăcile lui Peyer la mamifere). După ce şi-a îndeplinit rolul de a „învăţa" organismul să fabrice anticorpi, timusul, organ bine dezvoltat şi activ la naştere, devine inutil şi, ca atare, suferă un proces de regresie treptată, cu cît organismul se apropie de maturitate. Scurta lui perioadă de activitate are însă o importanţă deosebită pentru supravieţuire, deoarece acest organ dirijează dezvoltarea unui sistem imunitar care rămîne eficient pentru tot restul vieţii organismului.

h. Dinamica răspunsului imunitar

Răspunsul imun primar corespunde situaţiei în care organismul uman sau animal vine pentru prima oară în contact cu un anumit antigen. Într-o asemenea situaţie, o cantitate variabilă de antigen pătrunde în celulele forma-

[1] După Good, sistemul imun al omului este format din două linii celulare separate: *1) limfocitele mici* dependente de timus şi răspunzătoare de imunitatea celulară şi *2) sistemul producător de imunoglobuline* care asigură imunitatea humorală, reprezentat de plasmocit, care la om s-ar găsi în plăcile lui Peyer, apendice, amigdale etc., iar la păsări în bursa lui Fabricius. La origine plasmocitele ar putea proveni fie din diferenţierea aceleiaşi celule precursor ca şi limfocitul, fie chiar din lomfocit, după care ar fi „însămînţate" în organele limfoide periferice, unde ajung la maturitate morfologică şi funcţională probabil sub influenţa hormonului timic.

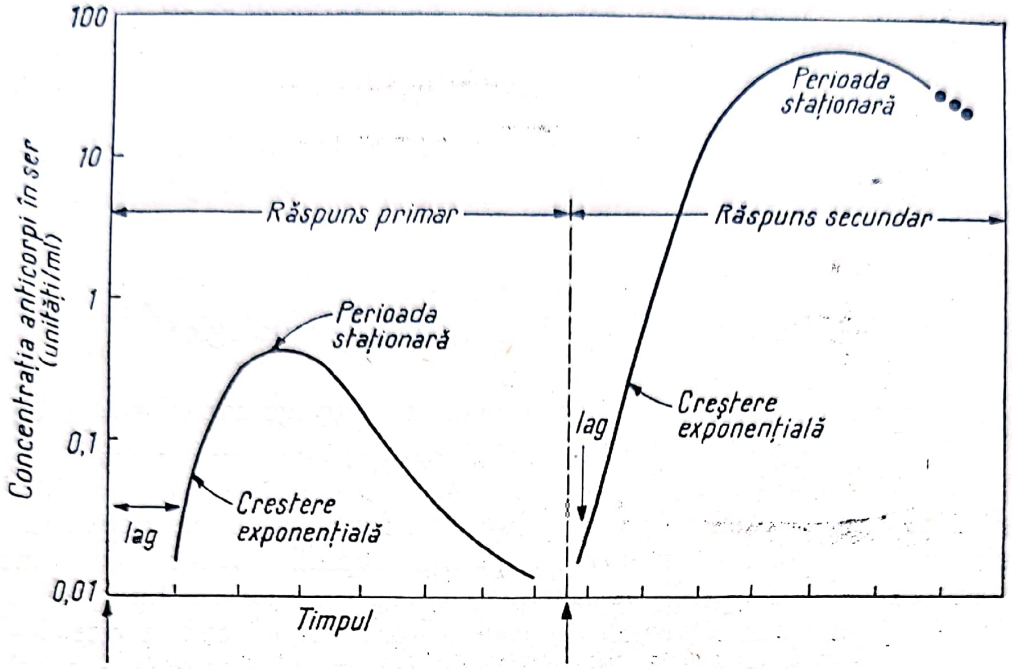


Fig. 402. Creşterea titrului anticorpilor circulanţi în cazul primului contact cu un antigen *(răspuns primar)* şi al repetării contactului cu acelaşi antigen *(răspuns secundar). Concentraţia anticorpilor este exprimată după o scară logaritmică.*

toare de anticorpi şi declanşează în ele biosinteza imunoglobulinelor. Curba sintezei anticorpilor are o evoluţie caracteristică: după o perioadă de latenţă cu durată variabilă, urmează o perioadă ascendentă, în cursul căreia cantitatea de anticorpi circulanţi creşte foarte rapid, apoi o perioadă de vîrf cu durată de obicei scurtă şi, final, o perioadă de declin care durează zile sau săptămîni. Răspunsul primar este în general proporţional cu doza de antigen, care determină celulele plasmatice „angajate" să fabrice anticorpi [1]. Răspunsul imun primar mai depinde şi de natura şi starea fizică a antigenului, de calea de administrare, ca şi de reactivitatea particulară a organismului imunizat.

Răspunsul imun secundar obţinut prin reintroducerea aceluiaşi antigen, după o perioadă de timp de minimum 10—20 de zile, este fundamental diferit de cel primar. Astfel, el se produce mult mai rapid, avînd o perioadă de latenţă mult mai scurtă, şi prezentînd o creştere mai accentuată a titrului de anticorpi, este mai intens, titrul maxim de anticorpi fiind mult mai ridicat decît în cazul răspunsului primar, efectul său imunizant este mult mai durabil — titrul maxim al anticorpilor menţinîndu-se mai mult timp ridicat şi scăzînd mai lent — şi, în sfîrşit, este calitativ diferit, exercitîndu-se prin elaborarea unui tip diferit de anticorpi. Astfel, în cursul imunizării celulele formează

[1] Această comportare a răspunsului primar explică probabil de ce vaccinurile cu germeni vii, capabili de a se multiplica în organism imunizează intens chiar în doză mică şi unică, în timp ce vaccinurile cu germeni omorîţi trebuie administrate în doze repetate pentru a se obţine un răspuns imun corespunzător.

iniţial anticorpi 19*S* apoi, pentru o scurtă perioadă de timp, anticorpi atît 19*S* cît şi 7*S* şi, în final, numai anticorpi 7*S*. În cazul răspunsului secundar lucrurile se petrec ca şi cum unele dintre celulele care au participat la realizarea răspunsului imun primar şi probabil şi descendenţii lor ar fi păstrat capacitate de a-şi „aminti" informaţia specifică sau orientarea primită cu ocazia contactului cu stimulul primar. De aceea, răspunsul imunologic de tip secundar poartă şi numele de *reacţie anamnestică*.

i. Bazele celulare ale memoriei imunologice

Sub denumirea de *„memorie" imunologică* se înţelege capacitatea unui organism de a da un răspuns imunitar de tip secundar în urma reîntîlnirii cu un anumit antigen specific.

Modificări celulare determinate de răspunsul imun secundar. Repetarea administrării unui antigen are ca urmare apariţia rapidă a unui număr mare de plasmocite capabile să proliferez rapid. La iepure, de exemplu, se observă aproximativ 8 generaţii de celule în care mitozele se succed la cîte 6—7 ore, astfel încît din fiecare celulă iniţială rezultă cam 100 de celule capabile să producă intens şi rapid anticorpul specific. Aceasta sugerează că prima expunere la antigen a pregătit organismul în aşa fel încît el să poată răspunde imediat ori de cîte ori „invadatorul" reapare. O asemenea pregătire s-ar realiza în cursul acţiunii stimulului primar prin transformarea precursorilor nespecifici ai plasmocitelor în celule precursoare specifice, care supuse pentru a doua oară acţiunii aceluiaşi antigen s-ar multiplica sub formă de celule plasmatice care „cunosc" antigenul respectiv şi, ca atare, sînt capabile să producă intens tipul corespunzător de anticorp.

Rolul limfocitului în păstrarea memoriei imunologice. Numeroase fapte de observaţie pledează pentru admiterea faptului că limfocitele *cu viaţă lungă* ar reprezenta suportul morfologic al memoriei imunologice.

Limfocitele cu viaţă lungă ar constitui deci şi din acest punct de vedere o populaţie eterogenă, alcătuită din numeroase „familii" celulare, care conservă fiecare „memoria" cîte unui antigen şi, ca atare, sînt capabile să reacţioneze prompt în prezenţa lui, evoluînd în sensul diferenţierii ca celule plasmatice care „ştiu" să elaboreze un anumit tip de anticorp. Fiecare „familie" de limfocite cu viaţă lungă s-ar forma, prin urmare, în urma unui prim contact cu antigenul, din celule „fără memorie" numite şi celule „nedeterminate", care nu ar fi altceva decît limfocite cu viaţă scurtă de origine timică. În felul acesta, timusul ar participa indirect şi în realizarea „memoriei" imunologice, reprezentînd organul de origine al unor celule capabile să preia şi să păstreze „amintirea" diferitelor antigene. Fiecare dintre aceste celule poartă „memoria" unui singur antigen sau poate chiar pe aceea a mai multor antigene înrudite, pe care o conservă pentru tot restul vieţii celulare şi pe care, datorită circulaţiei lor continue, o propagă în tot organismul. Un nou contact cu antigenul pentru care are „memorie" declanşează în acest tip de limfocit o serie de fenomene aşa-numite de *activare*, constînd din sinteza accelerată de acizi nucleici,

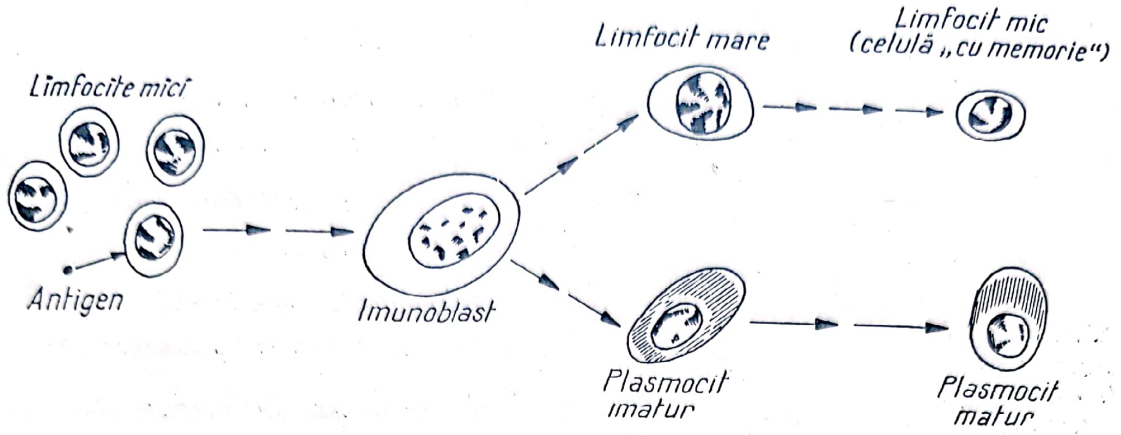


Fig. 403. Modificările celulelor limfoide după contactul lor cu un antigen. Antigenul „activat" (modificat prin degradare într-un macrofag) stimulează diferenţierea unor limfocite mici la imunoblaşti capabili de diviziune rapidă, din care derivă ulterior plasmocitele (celule formatoare de anticorpi) şi limfocitele cu viaţă lungă înzestrate cu „memorie" imunologică (după Davis).

creşterea volumului celulei şi transformarea ei în celulă de tip *blastic (stem-cell)*, care proliferează activ printr-o serie de mitoze.

Limfocitul cu viaţă lungă are deci şi funcţia de a *acumula* şi *păstra* materialul mnezic. El păstrează în nucleul său voluminos, codificate în acizi nucleici, nu numai informaţiile transmise pe cale genetică, ci şi „amintirea" experienţelor imunologice „trăite" după naşterea organismului. Limfocitul este tipul de celulă înzestrat cu „memorie" (H a l p e r n) şi capabil să păstreze informaţia „memorată" pe toată durata proprie sale vieţi şi, în genere, a vieţii organismului animal. În cazul în care limfocitul moare, nucleoproteinele sale sînt eliberate şi astfel pot fi recuperate de celulele vecine care „preiau schimbul", ceea ce echivalează cu o transcriere, respectiv cu un transfer direct, de informaţie dobîndită (M e d a w a r). În sfîrşit, limfocitele cu viaţă lungă, purtătoare de „memorie" imunologică şi apte să se multiplice şi să se diferenţieze dacă vin din nou în contact cu acelaşi antigen, reprezintă şi suportul morfologic al imunităţii celulare sau tisulare, care determină procesele de *hipersensibilitate întîrziată* (de tipul reacţiei la tuberculină) şi fenomenul de *respingere* a ţesuturilor şi a organelor grefate.

4. TIPURILE DE IMUNITATE

a. Rezistenţa sau imunitatea naturală

Rezistenţa sau imunitatea naturală, înnăscută sau congenitală, reprezintă capacitatea unui organism normal de a rămîne neafectat de un anumit agent patogen cu care vine în contact. Această proprietate reprezintă o însuşire *înăscută* a unei specii animale şi se transmite ereditar la descendenţi, ca şi alte caracteristici ale speciei, spre deosebire de imunitatea *dobîndită* în mod specific, care este o proprietate individuală, legată de un contact anterior al

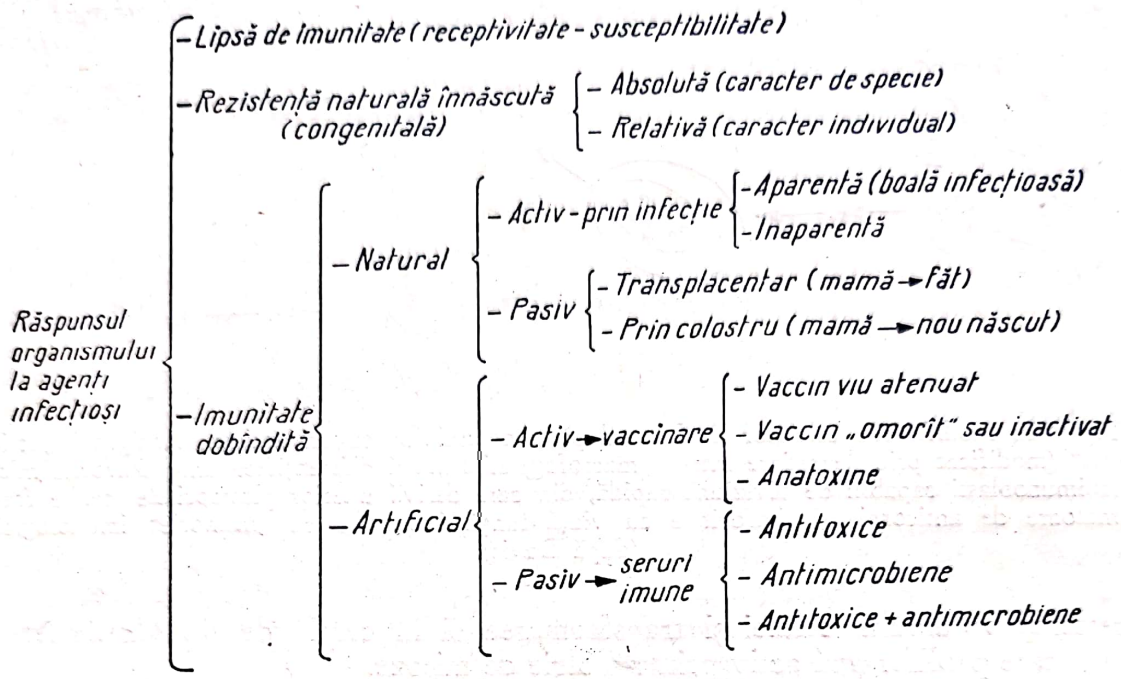


Fig. 404. Tipurile de răspuns ale organismului uman și animal față de agresiunea microorganismelor patogene.

organismului cu un anumit germen sau cu toxina lui. O nereceptivitate de acest tip, condiționată de particularități biologice congenitale, este în mod obișnuit absolută, în sensul că toți indivizii speciei respective sînt rezistenți față de un anumit agent patogen, chiar în cazul inocularii lui în doze mari. De exemplu, omul este rezistent la pesta bovină, pesta porcină, holera găinilor etc., iar animalele sînt rezistente la gonoree, rujeolă, oreion, dizenterie, holeră etc.

Starea diametral opusă acestui tip de imunitate este starea de *receptivitate* sau de sensibilitate (susceptibilitate) întîlnită la organismele care reacționează tipic, prin apariția unui proces infecțios, ca rezultat al agresiunii unui agent patogen. Starea de nereceptivitate este uneori relativă, în sensul că există deosebiri individuale de comportare în cadrul speciei, unii indivizi fiind total rezistenți, iar alții prezentînd diferite grade de receptivitate. În aceste cazuri, răspunsul diferit al organismelor de aceeași specie expuse contactului cu un anumit agent patogen ține de activitatea variabilă a forțelor de apărare ale organismului, care izolat sau în asociație opun agentului patogen o barieră de nepătruns în organism, determină inhibarea multiplicării sau distrugerea lui în sînge ori țesuturi, precum și neutralizarea și eliminarea substanțelor toxice liberate de germenii vii sau morți.

Ori de cîte ori, prin urmare, un agent patogen vine în contact cu o gazdă normală (neimunizată), instalarea lui în organismul acesteia este împiedicată în primul rînd de intrarea în acțiune a mecanismelor rezistenței constitutive. Aceste mecanisme de rezistență naturală prezente în mod normal la oricare

organism animal funcţionează prin intermediul unor factori cu acţiune nespecifică, reprezentaţi de *barierele mecanice* (pielea şi mucoasele), substanţele chimice antimicrobiene, fagocitoză, reacţiile inflamatorii etc.

Factorii mecanici ai apărării organismului. *Rolul pielii şi al mucoaselor normale.* Bacteriile patogene nu-şi pot exercita acţiunea decît după ce au trecut de anumite „bariere" care reprezintă prima linie de apărare a organismului împotriva invaziei microbiene.

Din cauza structurii lor anatomice, pielea şi mucoasele intacte, deşi direct accesibile, sînt în general impermeabile pentru microorganisme, care nu pot pătrunde prin ele decît pe calea unor soluţii de continuitate (răni, zgîrieturi etc.). Bacteriile pătrund mai uşor prin unele mucoase fine, ca cele oculare, respiratorii, intestinale sau genito-urinare, însă în acest caz sînt expuse acţiunii mecanice şi chimice a secreţiilor acestor mucoase.

Rolul protector al secreţiilor mucoase este evident în special în căile respiratorii superioare. Microorganismele ajunse în nări o dată cu aerul — şi care au scăpat de puternica acţiune de captare exercitată de mucoasa nazală căptuşită cu mucus lipicios şi în regiunea ei externă cu fire de păr — sînt antrenate de curentul de aer pe un traiect anatomic complicat prin sinusurile nazale şi proiectate cu putere pe stratul de mucus, în special în porţiunile strîmte ale căilor respiratorii superioare. Datorită acţiunii mecanice a cililor celulelor epiteliale, care execută mişcări active, un strat subţire de mucus se deplasează în permanenţă spre fundul gîtului, de unde este înghiţit. În afară de aceasta, tusea sau expiraţia forţată elimină excesul de mucus încărcat cu bacterii, împiedicînd astfel acumularea acestora. Curenţii de lichid mucos se deplasează foarte repede, adesea cu aproape 3 cm pe minut. Numai puţine bacterii, cele incluse în picături extrem de mici, pot să depăşească această barieră şi să ajungă în alveolele pulmonare.

Importanţa barierelor respiratorii este şi mai evidentă dacă se ţine seama de faptul că omul respiră zilnic peste 15 000 l aer, care conţine mai mult de 150 000 de bacterii, dintre care multe patogene. La iepurii puşi să inhaleze o atmosferă foarte încărcată cu *Serratia marcescens* s-a demonstrat experimental că numai 40% dintre bacterii ajung în pulmon şi numai 0,4% dintre ele trec de bronhiile mari.

O acţiune de îndepărtare mecanică a bacteriilor exercită şi diferite alte secreţii ale organismului care spală continuu sau periodic regiunile expuse. Lacrimile îndepărtează neîncetat bacteriile de la glanda lacrimală spre unghiul intern al ochiului şi de aici, prin canalul lacrimal, spre nas; saliva spală permanent cavitatea bucală, mucusul intestinal îndepărtează microorganismele de la suprafaţa epiteliului intestinal, iar urina antrenează periodic bacteriile din căile urinare inferioare.

Factorii chimici ai apărării organismului. Unele produse de secreţie ale organismului normal uman sau animal au o compoziţie chimică datorită căreia sînt capabile să exercite o puternică acţiune antibacteriană.

Secreţiile glandelor sebacee şi sudoripare determină rezistenţa pielii normale faţă de infecţiile bacteriane prin aceea că formează un adevărat înveliş de protecţie cu reacţie acidă *p*H 3—5). Se adaugă acţiunea antimicrobiană conferită de prezenţa în acele secreţii a unor acizi graşi cu lanţuri lungi, foarte

activi cînd se găsesc în stare liberă, condiţie favorizată de aciditatea normală a pielii. Datorită acestor acţiuni combinate, pielea are o putere autosterilizantă marcată, inegală în diferitele regiuni ale corpului (mai activă în regiunile palmară şi axilară) şi care încetează imediat după moarte. În unele cazuri, aciditatea unor secreţii ale mucoaselor este efectul activităţii anumitor bacterii saprofite; de exemplu, aciditatea vaginului adult (*p*H 4—4,4) rezultă din fermentarea glicogenului la acid lactic de către lactobacteria *B. döderlein.*

Sucul gastric protejează tractusul gastrointestinal de microorganismele pătrunse o dată cu alimentele şi de cele aduse de mucusul nazal înghiţit. El îşi datoreşte proprietăţile bactericide acidului clorhidric, într-o oarecare măsură pepsinei, dar şi unor factori încă neidentificaţi, deoarece rămîne activ şi după îndepărtarea enzimelor şi neutralizarea aciditătii.

Lizozimul, substanţă de natură proteică, este o enzimă hidrolizantă, cu greutate moleculară mică, prezentă în serul sanguin, lacrimi, salivă, secreţiile nazale şi extractele diferitelor organe, care degradează mureina din peretele celular al unor bacterii, producînd astfel liza corpului microbian. În general, bacteriile patogene sînt mai puţin sensibile la acţiunea lizozimului decît cele saprofite.

Serul sanguin normal conţine, pe lîngă lizozim, în cantităţi variind de la un individ la altul, şi alte substanţe cu proprietăţi antimicrobiene active asupra a numeroase specii de microorganisme. Aceste substanţe sînt α-lizina (identică probabil cu alexina sau complementul), activă pe bacteriile Gram-negative, β-lizina, activă pe bacteriile Gram-pozitive, şi opsoninele normale, substanţe termolabile similare dar nu identice alexinei.

Anticoprii protectori antimicrobieni (proveniţi din sînge), care intră în compoziţia mucusului anumitor mucoase, pot împiedica infecţia cu unii agenţi patogeni (pneumococ, virus gripal etc.).

Substanţele cu acţiune antimicrobiană obţinute prin extracţie din diferite organe şi ţesuturi, sînt reprezentate de proteine şi polipeptide bazice, poliamine, steroli etc. Ele par a-şi datora efectul interferenţei cu metabolismul microbian sau blocării anumitor sisteme enzimatice esenţiale ale parazitului.

Factorii biologici ai rezistenţei organismului. Unul dintre factorii determinanţi ai stării de nereceptivitate este *procesul de fagocitoză* prin care, după cum s-a arătat, microorganismele patogene pătrunse în organism sînt înglobate şi digerate în celule specializate, care fac parte din elementele celulare sanguine (polimorfonucleare neutrofile şi monocite) sau sînt răspîndite în ţesuturile bogate în elemente ale sistemului reticuloendotelial.

Mecanismele pasive de apărare a organismului. În această categorie intră o serie de factori care fac ca ţesuturile normale să nu fie potrivite pentru multiplicarea bacteriilor.

— *Temperatura corpului.* Influenţa mediului, reprezentat de ţesuturile gazdei asupra multiplicării parazitului, a fost demonstrată pentru prima dată de Pasteur. El a arătat că, deşi în mod natural este rezistentă la cărbune, găina poate fi infectată cu *B. anthracis* (bacilul cărbunelui) dacă i se scade temperatura corpului la 37° prin scufundare în apă rece. De asemenea, iepurii, care au rezistenţă naturală la infecţia cu *Treponema pallidum* (agentul sifilisului), devin sensibili la acţiunea acestei spirochete dacă sînt expuşi la frig. Este

probabil că scăderea temperaturii corpului determină un important număr de modificări ale mecanismelor fiziologice de apărare care influenţează evoluţia procesului infecţios. Dimpotrivă, rezistenţa organismului uman la infecţia cu virus herpetic scade la temperaturi ridicate ale corpului. De asemenea, broaştele — natural rezistente la tetanos — fac boala dacă sînt încălzite la 37°C.

— *Rolul tensiunii de* O_2 *în ţesuturi* este foarte evident în cazul bacteriilor anaerobe, printre care agenţii gangrenei gazoase *(Clostridium welchii, Cl. oedematiens)* şi bacilul tetanic. Aceşti germeni nu parazitează ţesuturile normale, însă se dezvoltă foarte bine în ţesuturile „devitalizate", în care oxigenul atmosferic sau cel sanguin nu au acces, ceea ce creează condiţii de anaerobioză favorabile pentru dezvoltarea lor. Începînd să se multiplice în astfel de ţesuturi, germenii anaerobi îşi creează singuri în continuare condiţii favorabile, secretînd o toxină necrozantă care devitalizează ţesuturile şi le scade concentraţia în O_2. Scăderea tensiunii de O_2 în limite favorabile pentru aceşti germeni se poate realiza şi prin asocierea lor cu bacterii aerobe care consumă cantităţi mari de O_2. Invers, *Mycobacterium tuberculosis,* agentul patogen al tuberculozei, care are nevoie de o cantitate mare de O_2, se dezvoltă cu predilecţie în pulmon, unde oxigenarea este bună. El dispare din leziunile închise şi necrotice, neaerate, şi din contră ajunge să se dezvolte în număr foarte mare în leziunile din zona internă a cavităţilor aerate deschise în bronhii.

Rezistenţa naturală a organismului faţă de infecţii mai este influenţată negativ de o serie de factori ca subnutriţia, hipo- şi avitaminozele, oboseala, alte infecţii concomitente sau anterioare etc.

b. Imunitatea dobîndită

Spre deosebire de imunitatea naturală înnăscută, care are un caracter nespecific sub raportul mecanismelor care o asigură şi care este o proprietate predominant de specie, cu diferenţe individuale mici, imunitatea dobîndită, de natură specifică, este o stare de rezistenţă antiinfecţioasă caracterizată prin aceea că, în cadrul aceleiaşi specii, comportarea organismelor individuale este foarte variată, în funcţie de contactul lor anterior cu microorganismul respectiv, viu şi virulent sau cu produsele lui toxice (boală) sau viu şi cu virulenţa atenuată ori omorît (vaccinare cu corpi microbieni) sau cu produsele lui toxice modificate (vaccinare cu anatoxine). Imunitatea dobîndită, numită şi inductibilă, deoarece s-a constituit ca răspuns la contactul cu un stimul specific reprezentat de agentul patogen sau produsele sale, este de obicei relativă, în sensul că, deşi în general este foarte solidă, poate fi învinsă prin agresiunea exercitată de o cantitate foarte mare de germeni sau de atacul unei tulpini deosebit de virulente.

În funcţie de originea şi modul ei de instalare, imunitatea dobîndită este de două tipuri: dobîndită în mod *natural* şi dobîndită în mod *artificial,* după cum inducţia stării de imunitate a fost independentă de intervenţia voită a omului sau determinată de ea. În cazul ambelor tipuri imunitatea poate fi dobîndită atît *activ,* prin răspuns imun propriu la stimulul antigenic, cît şi *pasiv,* prin transfer de anticorpi exogeni.

Scanned with OKEN Scanner

Imunitatea dobîndită natural: 1) *Imunitatea dobîndită natural în mod activ* se observă la persoane care au făcut o infecţie microbiană aparentă (decelabilă clinic) sau inaparentă şi care au devenit astfel rezistente la o reîmbolnăvire. Durata acestei stări de imunitate este variabilă. Trecerea prin unele infecţii asigură o protecţie specifică eficace pentru tot restul vieţii (rujeola, variola, varicela, oreionul); alte infecţii (difteria, scarlatina, tusea convulsivă etc.) conferă o protecţie mai puţin solidă, în aşa fel încît după cîţiva ani, la o nouă expunere organismele respective pot face din nou boala, însă într-o formă mai uşoară decît în cazul primei îmbolnăviri. În sfîrşit, după alte infecţii, starea de imunitate durează numai 1—3 ani (gripa) sau cel mult cîteva săptămîni (guturaiul virotic). Explicaţia acestei comportări variabile nu este cunoscută. Este probabil că, în cazul bolilor provocate de specii bacteriene sau virale ale căror tulpini sînt de o mare diversitate antigenică, imunitatea se creează numai faţă de tulpina care a provocat infecţia şi doar în foarte mică măsură, sau chiar de loc, faţă de alte tulpini, diferite antigenic, din aceeaşi specie. Ca mecanism, această imunitate ţine de prezenţa în organismul care a trecut prin boală a anticorpilor specifici faţă de agentul patogen şi, mai ales, de faptul că organismul a dobîndit o reactivitate deosebită legată de „memoria" sa imunologică datorită căreia, la un contact ulterior cu antigenul respectiv, el va reacţiona foarte activ, împiedicînd evoluţia infecţiei.

2) *Imunitatea dobîndită natural în mod pasiv* este rezultatul transmiterii transplacentare a anticorpilor de la mamă la făt şi al transferului lor prin colostru de la mamă la nou-născut. Cum prezenţa a diferiţi anticorpi şi cantitatea lor variază de la un organism matern la altul în funcţie de bolile suferite sau de vaccinurile primite, această formă de imunitate caracteristică nou-născutului este şi ea variabilă calitativ şi cantitativ. În plus, transmisiunea, prin filtrul placentar a γ-globulinelor normale şi a anticorpilor este un fenomen fiziologic care depinde de structura placentei, respectiv de numărul de straturi tisulare interpuse între circulaţia maternă şi cea fetală. Astfel, tranzitul anticorpilor este mic la animalele care au placenta cu structură epiteliocorială (cu 7 straturi de ţesut) cum sînt bovinele, cabalinele şi porcinele şi, din contră, este mare la cele cu placenta hemocorială cum sînt omul, maimuţa, rozătoarele. La om, nou-născutul mai primeşte anticorpi materni şi după naştere, prin colostrul bogat în substanţe imune provenite din circulaţia maternă (permeabilitatea marcată a epiteliului intestinal al copilului nou-născut permite transferul de imunitate şi pe cale digestivă).

Imunitatea dobîndită în mod natural şi pasiv asigură nou-născutului o stare de nereceptivitate faţă de bolile la care mama este imună şi faţă de care el însuşi dispune de substanţele protectoare de origine maternă primite prin intermediul placentei. Datorită acestui fapt, copilul nou-născut poate fi imun faţă de o serie de boli — pentru care a primit anticorpi protectori — şi, din contra, poate fi receptiv pentru altele. Această imunitate scade treptat după naştere, prin dispariţia anticorpilor materni din organismul copilului, în aşa fel încît, după o perioadă variabilă de timp (3—6 luni), acesta devine sensibil faţă de agenţii patogeni respectivi, deoarece, o dată cu anticorpii specifici,

el nu a moştenit şi capacitatea caracteristică imunităţii active de a reface şi menţine aceşti anticorpi la un nivel de concentraţie adecvat. Imunitatea transplacentară explică raritatea bolilor infecţioase la copil în primele trei luni după naştere.

Imunitatea dobîndită artificial reprezintă o stare de rezistenţă a organismului realizată prin intervenţia voită a omului, respectiv prin injectarea unor produse biologice capabile să stimuleze formarea anticorpilor protectori (vaccinuri) sau conţinînd aceste substanţe protectoare, gata formate (seruri imune). În primul caz, cînd organismul uman sau animal îşi formează aceste substanţe protectoare singur, prin propriile sale mijloace, imunitatea dobîndită este *activă;* în cel de-al doilea, cînd le primeşte ca atare, imunitatea dobîndită este *pasivă.*

1) *Imunitatea dobîndită artificial în mod activ.* **Vaccinurile** sînt produse biologice care conţin fie germeni vii cu virulenţa atenuată, fie germeni omorîţi, fie toxine modificate (anatoxine) şi care, introduse în organismul uman sau animal, stimulează formarea de anticorpi protectori specifici, generînd o stare de imunitate temporară faţă de agentul din care au fost preparate.

Istoric. Vaccinarea îşi are originea în observaţia foarte veche că foştii bolnavi de boli infecţioase nu se mai reîmbolnăvesc în cursul epidemiilor următoare. Pe această observaţie s-a bazat încercarea de a provoca în mod voit o boală uşoară şi imunogenă, practicată în India şi China încă din secolul al XI-lea sub forma *variolizării.* Pentru a imuniza împotriva variolei, boală de o gravitate excepţională, de cele mai multe ori mortală, chinezii uscau şi pisau crustele fine recoltate de pe pielea bolnavilor şi le introduceau prin nas la oamenii sănătoşi, iar brahmanii indieni aplicau în acelaşi scop hainele fostului bolnav şi ţesături impregnate cu puroi variolic pe pielea lezată a unui indian sănătos. Variolizarea avea marele inconvenient că producea uneori boala în forme grave şi chiar mortale, înmulţind astfel numărul de cazuri în colectivităţi. În ţara noastră, variolizarea prin transmitere de la om la om se practica încă înainte de 1720.

În anul 1798, medicul englez Edward Jenner a demonstrat că persoanele care au suferit o boală foarte uşoară — variola vacilor (vaccina) — sînt rezistente faţă de variolă, atît după îmbolnăvirea în condiţii naturale cît şi după inocularea voită, artificială, a acestei boli. Spre deosebire de variolă, vaccina, care dă la animale leziuni localizate la nivelul ugerului, produce la om o boală foarte uşoară, localizată în general la mîini (la mulgători), care însă imunizează faţă de variolă, putînd fi deci folosită pentru a crea o stare de protecţie împotriva acesteia. La început, vaccina era transmisă în serie de la om la om, însă, cu timpul, pentru a preîntîmpina riscul de a se transmite şi alte boli, risc care se adaugă la greutăţile legate de această practică, s-a recurs la transmiterea ei în serie pe animal. Cu timpul, această inoculare a primit numele de *vaccinare* (de la lat. *vacca*=vacă).

Documentele vremii arată că în ţara noastră, în perioada 1802—1807, se folosea în Transilvania, ca o practică de medicină populară, îmbăierea copiilor mici în lapte cu care fusese spălat ugerul vacilor bolnave de vaccină. Copiii făceau o erupţie similară aceleia de la vaci, mai mult sau mai puţin întinsă, după care se vindecau şi scăpau de „vărsatul cel rău" (V. Bologa). Bazele ştiinţifice ale vaccinării au fost puse de L. Pasteur o dată cu descoperirea vaccinurilor contra holerei găinilor, a cărbunelui şi a turbării.

Vaccinurile vii constau din suspensii de bacterii sau virusuri vii, dar cu virulenţa atenuată în aşa fel încît să nu mai poată determina boala la om, dar să rămînă capabile să iniţieze o infecţie inaparentă, imunogenă. Prin urmare, vaccinurile vii sînt produse care conţin un număr relativ mic de corpi microbieni viabili dar slab virulenţi şi care, administrate la om într-o singură injecţie, determină o imunitate solidă, comparabilă aceleia consecutive trecerii prin boală, fără să fi provocat însă decît cel mult semne minime de boală.

Indiferent de locul inoculării, agentul infecţios din vaccinul viu nu rămîne localizat, ci se răspîndeşte în organism pătrunzînd şi multiplicîndu-se în aceleaşi ţesuturi în care se localizează şi în cazul infecţiei naturale. Singura deosebire faţă de agentul patogen virulent este aceea că, infectînd un număr mai mic de celule sensibile şi multiplicîndu-se lent, agentul infecţios din vaccin nu declanşează o boală clinică, ci numai o infecţie de formă atenuată, care este însă însoţită de modificări umorale şi de reactivitate, necesare pentru instalarea stării de imunitate.

Condiţia cea mai importantă în prepararea vaccinurilor este aceea ca atenuarea virulenţei agenţilor patogeni să fie *stabilită* şi *ireversibilă,* pentru ca vaccinarea să nu dăuneze persoanelor vaccinate şi să nu creeze focare noi de infecţie în colectivităţi.

În practică se folosesc vaccinuri vii conţinînd mutante de bacterii sau virusuri cu virulenţă atenuată, selecţionate prin cultivarea unor tulpini sălbatice la temperaturi nefavorabile (de exemplu, la o temperatură superioară celei optime în cazul vaccinului contra cărbunelui), prin acţiunea unor substanţe chimice şi medii de cultură nefavorabile (vaccinul BCG contra tuberculozei), sau prin treceri în serie pe animale (vaccinul contra turbării etc.). Vaccinul antivariolic conţine un virus diferit de acela împotriva căruia se face imunizarea, şi anume virusul vaccinei, pentru care omul nu este o gazdă naturală. Se admite astăzi că cele două virusuri ar deriva dintr-un strămoş comun, pornind de la care virusul variolei s-a diferenţiat prin adaptare la om, iar cel al vaccinei prin adaptare la bovidee. Ca rămăşiţă a acestei înrudiri ancestrale, cele două virusuri păstrează capacitatea de a imuniza încrucişat (unul faţă de celălalt), folosită în practica vaccinării. Alte vaccinuri vii intrate în uz sînt cele utilizate în profilaxia rujeolei şi a poliomielitei (vaccinul oral) la om şi în profilaxia brucelozei la animale.

Vaccinurile omorîte constau din suspensii microbiene omorîte prin încălzire la temperaturi ridicate (60°C) ori sub acţiunea formolului sau fenolului şi care conţin totdeauna una dintre aceste substanţe ca prezervant. Din această categorie fac parte, de exemplu, vaccinurile antitifoparatific (TAB), antipertussis (contra tusei convulsive), antistafilococic, antipoliomielitic injectabil etc.

Anatoxinele sînt produse imunizante obţinute prin tratarea exotoxinelor cu formol 4‰ şi căldură. În aceste condiţii, toxinele îşi pierd complet toxicitatea, dar îşi păstrează intactă proprietatea imunogenă reprezentată de capacitatea de a stimula formarea de anticorpi protectori. Preparate de acest fel sînt, de exemplu, anatoxina difterică, anatoxina tetanică, anatoxina stafilococică etc.

După conţinutul lor, vaccinurile pot fi *monovalente,* cu o singură specie microbiană sau virală (de exemplu, vaccinul antistafilococic), *bi- tri-* sau *polivalente,* care conţin respectiv corpi microbieni sau anatoxină provenind de la 2—3 sau mai multe specii de microorganisme (de exemplu, vaccinul difterotetano-pertussis).

După provenienţa germenilor folosiţi la prepararea vaccinului se poate vorbi de *autovaccin,* vaccin preparat cu o tulpină microbiană recoltată de la un bolnav şi destinat a fi folosit numai de bolnavul respectiv şi de *stock-vaccinuri,* produse în general din mai multe tulpini şi destinate a fi folosite pentru imunizări în masă.

Caracterele generale ale imunităţii artificiale active. Vaccinurile omorîte şi anatoxinele se administrează, în general, pe cale *parenterală* (subcutanat, intramuscular, intradermic etc.), în mod obişnuit în trei injecţii separate, la intervale de 5—7—21 de zile; vaccinurile vii se administrează într-o singură injecţie. Unele vaccinuri vii ca, de exemplu, vaccinul antipoliomielitic cu virus viu sau vaccinul BCG (la nou-născuţi) se administrează pe cale *orală.*

Imunitatea consecutivă vaccinării se instalează relativ lent, la aproximativ 15—20 de zile de la ultima injecţie şi durează un timp variabil de la un vaccin la altul (în general, între 1 şi 7 ani), scăzînd treptat pînă la dispariţia completă. Vaccinarea primară, ca şi infecţia, conferă organismului o stare specială de reactivitate — „memoria imunologică" — graţie căreia orice contact ulterior cu agentul patogen respectiv, realizat pe cale naturală (prin boală) sau artificială (prin vaccinare), declanşează o „redeşteptare" rapidă a imunităţii iniţiale, care de obicei se manifestă cu o intensitate mai mare decît aceea a răspunsului imunitar postvaccinal. Acest efect al vaccinării este folosit în practică pentru „redeşteptarea" şi intensificarea imunităţii vaccinale, ceea ce se realizează practicîndu-se anual o injecţie unică de *„redeşteptare" a imunităţii* („de rappel"), care declanşează o reacţie anamnestică de creştere bruscă şi masivă a titrului anticorpilor.

Deşi este destul de solidă, imunitatea vaccinală este relativă, în sensul că unele persoane vaccinate pot totuşi să facă boala (de obicei însă o boală uşoară), mai ales dacă se infectează masiv sau cu un germen deosebit de virulent. Datorită faptului că se instalează lent, imunizarea prin vaccinare este folosită în scop profilactic, pentru a se evita riscul eventual de infectare cu un agent patogen.

2) *Imunitatea artificială pasivă.* **Serurile imune** sau terapeutice sînt produse biologice obţinute din serul sanguin al unui animal imunizat activ prin vaccinare sau al unui convalescent imunizat activ prin boală. În ambele cazuri, serul conţine anticorpi protectori specifici, capabili să neutralizeze acţiunea antigenului respectiv. Primele încercări de folosire a serurilor în terapeutică datează din 1888, cînd Richet şi Héricourt demonstrează că inocularea unor culturi bacteriene la un animal determină apariţia în serul lui sanguin a unor substanţe care pot proteja nu numai organismul care le-a produs, ci şi organismele la care acest ser este inoculat.

Serurile imune se prepară, în general, pe animale mari (de obicei pe cal), care sînt imunizate, după principiile generale ale imunizării active, cu doze repetate crescînde de corpi microbieni, anatoxine sau toxine. Serul sanguin obţinut prin sîngerarea animalelor imune este inactivat şi tratat cu fenol (prezervant), apoi controlat pentru sterilitate, inocuitate (lipsa de nocivitate) şi eficacitate (concentraţie în anticorpi). El se administrează sub formă de injecţii intravenoase, intramusculare sau subcutane. După cum specia organismului donator este sau nu aceeaşi cu a organismului receptor, serurile pot fi *omologe* (de exemplu, serurile de convalescent de rujeolă sau de tifos exantematic), sau *eterologe* (serurile preparate pe cai pentru om). După natura antigenelor folosite pentru imunizarea animalului donator de anticorpi, serurile

sînt de trei categorii: *1) antimicrobiene*, preparate prin administrarea de corpi microbieni (de exemplu, serurile antistreptococic şi antimeningococice); *2) antitoxice*, obţinute prin injectarea de toxină şi anatoxină (de exemplu, serurile antidifteric şi antitetanic); *3) mixte* (antimicrobiene şi antitoxice) obţinute prin imunizarea cu corpi microbieni şi cu toxine (de exemplu, serul antigangrenos). După numărul antigenelor folosite la imunizare, serurile sînt *monovalente* (conţinînd anticorpi faţă de un singur antigen) sau *polivalente* (conţinînd anticorpi faţă de mai multe antigene diferite).

Caracterele generale ale imunităţii artificiale pasive. Imunitatea pasivă, consecutivă administrării de seruri imune, se instalează imediat după injectarea intravenoasă sau după cîteva ore, pe măsura resorbţiei anticorpilor, în cazul administrării pe alte căi. Imunitatea pasivă asigură o protecţie de scurtă durată (circa 30 de zile), datorită faptului că anticorpii primiţi în mod pasiv, au un „timp de înjumătăţire" de 14 zile. Persistenţa lor este mai îndelungată dacă serul provine de la un organism de aceeaşi specie cu organismul receptor, deoarece imunoglobulina omologă este acceptată şi reţinută mai bine în organismul receptorului decît cea heterologă.

În momentul în care anticorpii exogeni sînt eliminaţi, organismul redevine receptiv faţă de infecţie. Datorită acestei particularităţi, serurile imune sînt folosite în special pentru tratamentul unei boli în evoluţie (*seroterapie*). Serurile imune antitoxice, ca şi serurile antivirale, acţionează în mod obişnuit acoperind cu anticorpi suprafaţa moleculelor de toxină şi a particulelor virale, ceea ce alterează configuraţiile chimice specifice care asigură agentului toxic sau viral adsorbţia pe celulele sensibile. Datorită acestui mecanism de acţiune, eficienţa lor este maximă în cazul unei administrări cît mai precoce. Celulele lezate de toxine, ca şi acelea în care virusul a pătruns deja, nu mai pot fi apărate de anticorpii din serul imun.

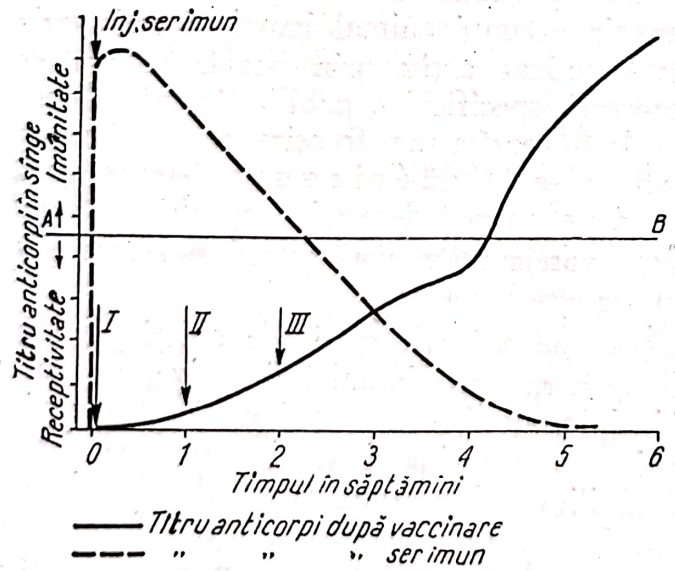


Fig. 405. Reprezentare schematică a evoluţiei titrului anticorpilor după vaccinare şi după administrarea de ser imun:

I, II, III — datele efectuării injecţiilor de vaccin. Linia *A—B* corespunde convenţional titrului minim de anticorpi care asigură protecţia faţă de boală.

Serurile antimicrobiene acţionează făcînd bacteriile mai sensibile la acţiunea fagocitelor şi a complementului. Serurile imune pot fi folosite şi în scop preventiv (seroprofilaxie) la persoane care au fost sigur în pericol de a se infecta şi la care urmărim să preîntîmpinăm declanşarea bolii. Pentru a se evita riscurile de infecţie care pot surveni după epuizarea imunităţii pasive, se recomandă ca seroterapiei şi seroprofilaxiei să li se asocieze vaccinarea, aceasta lăsînd o imunitate activă de lungă durată, care se instalează după eliminarea anticor-

pilor introduşi artificial în organism. În prezent se folosesc seruri imune concentrate şi purificate, din care s-au eliminat aproximativ $^3/_4$ din proteinele serului sanguin, păstrîndu-se numai fracţiunea globulinică specifică (anticorpi). Prin acest procedeu s-a redus foarte mult volumul serului injectat şi se evită accidentele care ar putea rezulta din sensibilizarea omului la substanţele proteice nespecifice din serul de cal (tab. 27).

TABELUL 27

CARACTERELE DIFERENŢIALE ALE IMUNITĂŢII ARTIFICIALE ACTIVE ŞI PASIVE

Tipul de imunizare	Imunizarea activă	Imunizarea pasivă
Produsul injectat	Vaccin (antigen)	Ser imun (anticorpi)
Modul de producere	Formare activă de anticorpi	Primire pasivă de anticorpi formaţi de alt organism
Modul de instalare	Lent (15—20 zile de la ultima injecţie)	Imediat sau la cîteva ore de la injecţie
Durata	Lungă (luni sau ani)	
Scopul	Profilactic (uneori terapeutic)	Terapeutic (uneori profilactic) Scurtă (aproximativ 30 de zile)

Răspunsul imun al nevertebratelor. Reacţiile celulare de apărare au fost urmărite la metazoare aflate pe diferite trepte ale scării taxonometrice. Metchnikoff a demonstrat că la larvele de *Astropecten* la care celulele mezodermice înoată în cavitatea corpului într-o substanţă semilichidă, pătrunderea unui corp străin prin stratul ectodermic determină migrarea acestor celule înspre materialul exogen pe care-l înconjură formînd un plasmodium. Deci, reacţia faţă de iritantul exogen constă într-un aflux de celule cu rol de protecţie, care îl imobilizează şi îl digeră. De asemenea, bacteriile introduse sub ectoderm la larva transparentă de *Bipinnaria asterigera* sînt înconjurate de celule fagocitare care le ingeră şi digeră.

Rezultatele cele mai evidente au fost obţinute de Metchnikoff în experienţele cu crustaceul de apă dulce *Daphnia magna* efectuate cu ocazia studiilor sale asupra digestiei intracelulare la nevertebrate. El a observat că dafniile pot fi infectate cu sporii unui microorganism levuriform Metschnikowia *(Monospora bicuspidata)*, care pătrund o dată cu hrana. Din tubul digestiv, datorită vîrfurilor lor ascuţite, sporii pătrund în cavitatea generală, unde sînt înconjuraţi de celule mobile *(amibocite)* care îi înglobează şi digeră. Cînd numărul sporilor este prea mare, cei care nu ajung să fie ingeraţi germinează şi dau torule mature, care multiplicîndu-se produc moartea crustaceului. Celule comparabile funcţional fagocitelor şi aparţinînd probabil S.R.E. au fost descrise în hemolimfa a numeroase nevertebrate (Cantacuzino).

În general, reacţiile de apărare ale organismelor inferioare constau în migrarea spre zona lezată a anumitor celule dotate cu proprietăţi fagocitare, urmată de ingestia particulelor care au produs iritaţia (bacterii etc.). După cum a

arătat Metchnikoff, acest proces, care la amibă reprezintă o modalitate primitivă de nutriţie, s-a transformat în cursul diferenţierii celulare, o dată cu creşterea complexităţii corpului animal, într-o reacţie de apărare cu ajutorul căreia organismul luptă împotriva microorganismelor invadatoare. În felul acesta, după Metchnikoff, apărarea celulară — fagocitoza — nu reprezintă decît o adaptare realizată filogenetic, a unei funcţii fiziologice generale, proprie vieţii sub toate formele, şi anume funcţia de digestie.

Absenţa elementelor din seria limfoidă explică lipsa anticorpilor circulanţi la nevertebrate şi, ca atare, a răspunsului imun cu caracter de specificitate. La insecte, la care cea mai mare parte din celulele circulante în hemolimfă au proprietăţi fagocitare, a fost descrisă numai prezenţa unor substanţe antimicrobiene de tipul *properdinei* şi a unor substanţe bactericide nespecifice de tipul *bacteriolizinelor* de la mamifere.

Scanned with OKEN Scanner

NOŢIUNI DE MICROBIOLOGIA INSECTELOR

Microbiologia insectelor [1], una dintre ramurile aplicate ale microbiologiei, studiază microflora saprofită şi patogenă a unor artropode (insecte şi acarieni) şi relaţiile ecologice dintre microorganisme şi gazde. Cu toate că în acest domeniu s-au făcut cercetări încă de la sfîrşitul secolului trecut (A. Bassi, 1934, L. Pasteur, 1865), microbiologia insectelor s-a consolidat ca ştiinţă abia în ultimii ani, cînd a apărut şi primul tratat în acest domeniu (E. A. Steinhaus, 1947).

Microbiologia insectelor are largi aplicaţii practice în primul rînd în agricultură, zootehnie şi medicină, întrucît are ca obiect relaţiile dintre microorganismele care produc boli la plantele de cultură, la animale şi la om, pe de o parte, şi artropodele vectoare, pe de altă parte. De asemenea, rezultatele unor cercetări în acest domeniu sugerează posibilităţi practice de combatere a insectelor dăunătoare cu ajutorul microorganismelor.

Între microorganisme şi artropode există toate tipurile de relaţii biotice cunoscute. În unele cazuri, insectele poartă temporar şi transmit un microb complet inofensiv, alteori transmit un agent patogen pentru om, animale sau plante. Uneori insectele beneficiază de pe urma microorganismelor cu care sînt infectate, acestea servindu-le ca hrană sau ca sursă de enzime ori de vitamine; alteori mor sub acţiunea unui parazit patogen.

În ceea ce priveşte specificitatea relaţiilor, ea este uneori foarte strictă, în sensul că unele microorganisme sînt capabile să trăiască numai în asociaţie cu o anumită specie sau cu un anumit grup de insecte. Atunci însă cînd este vorba de microorganisme banale — saprofite — legătura cu organismul insecteigazdă este numai întîmplătoare şi temporară. În asociaţii cu artropodele intră reprezentanţi ai următoarelor grupe sistematice: virusuri, bacterii, drojdii, mucegaiuri şi protozoare.

Microflora insectelor — şi în special cea externă — este mult influenţată calitativ şi cantitativ de mediul lor de viaţă. Astfel, la artropodele din sol se găsesc germeni aparţinînd microflorei solului, în timp ce la cele care trăiesc pe animale se găsesc microorganisme caracteristice acestora, luate de pe pielea

[1] Denumirea de *microbiologie a insectelor* nu este corectă din punctul de vedere al taxonomiei organismelor-gazdă, care pot fi nu numai insecte, ci şi căpuşe şi alţi acarieni. Fiind însă intrată în uz şi acceptată în mod convenţional, ea este folosită ca atare în capitolul de faţă.

Scanned with OKEN Scanner

sau blana lor. Microflora variază cantitativ şi calitativ şi în funcţie de stadiul de dezvoltare a artropodelor — după cît se pare, în primul rînd din cauza unor factori legaţi de tipul de nutriţie — şi, în plus, este diferită după anotimp, datorită schimbării mediului de viaţă al gazdei de-a lungul anului.

Cunoştinţele referitoare la caracterul şi semnificaţia relaţiilor dintre microorganisme şi artropode sînt relativ restrînse, fiind bazate doar pe fapte de observaţie din natură sau experimentale, în legătură cu anumite specii-gazdă. Unele dintre ele pot fi însă socotite ca avînd un caracter general, datorită unor analogii foarte evidente.

1. MICROFLORA CONTAMINANTĂ A ARTROPODELOR

Microflora contaminantă este reprezentată de microorganisme prezente în mod normal în mediul extern şi care se pot asocia temporar cu artropodele, trăind fie la suprafaţa corpului acestora *(contaminanţi externi)*, fie în interiorul lui *(contaminanţi interni)*.

Natura şi numărul contaminanţilor externi (bacterii, levuri, mucegaiuri) sînt variabile şi reflectă particularităţile mediului în care au loc dezvoltarea, hrănirea sau alte activităţi biologice ale gazdei. În cel mai mare număr ei se găsesc la insectele care frecventează locuri murdare, cu multă substanţă organică în curs de descompunere, care favorizează dezvoltarea intensă a microflorei de fermentaţie şi putrefacţie. Această microfloră, foarte bogată ca număr de indivizi şi compoziţie în specii, variază în funcţie de anotimp dar se modifică frecvent şi în raport cu particularităţile locale de poluare (cu excrete, cu cadavre etc.) a mediului contaminant. Uneori, în componenţa ei intră şi microorganisme cu importanţă medicală sau fitopatologică. Microflora este mult mai abundentă la insectele înzestrate cu diferite formaţii anatomice (peri etc.), care favorizează fixarea bacteriilor. Totuşi, chiar la insectele care prin modul lor de viaţă sînt expuse la contaminări masive — aşa cum sînt muştele — numărul microorganismelor de pe suprafaţa externă a corpului este mult mai mic (de cel puţin 10—15 ori) decît al celor din interiorul lui. El este cuprins, pentru un exemplar, între 30 000 şi 100 000 de bacterii pe suprafaţa tegumentelor faţă de 1—2 500 000 de bacterii în interiorul corpului şi este mult influenţat de posibilităţile de contaminare

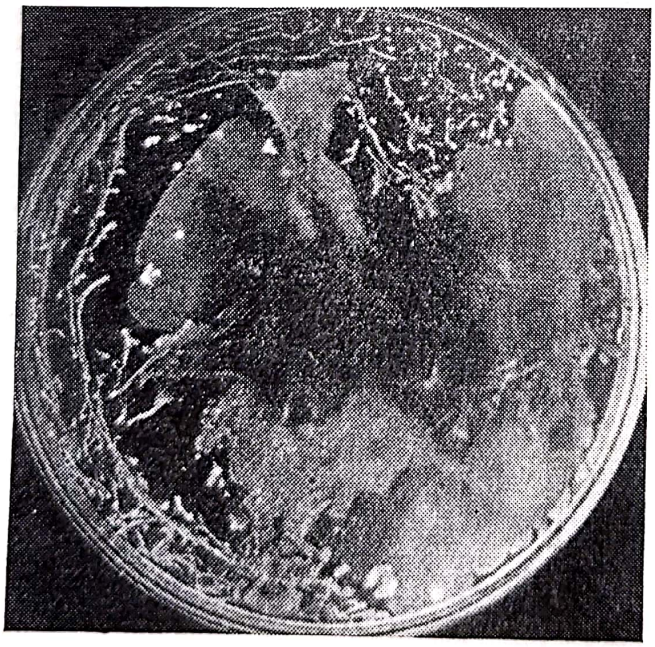


Fig. 406. Aspectul unei culturi bacteriene dezvoltată pe un mediu de cultură cu agar pe urmele unei muşte domestice (după Chandler).

existente la un moment dat în mediu. Limitarea numărului contaminanţilor externi se datoreşte mai ales proprietăţilor particulare ale cuticulei, care fiind uscată şi netedă constituie un substrat nefavorabil pentru aderarea şi multiplicarea microorganismelor.

Contaminarea internă a artropodelor are aceeaşi origine ca şi contaminarea externă, dar se realizează *numai în funcţie de diferiţi factori fiziologici şi imunitari* care îngăduie sau nu localizarea şi multiplicarea microbiană în organism. Aceştia sînt localizaţi, de obicei, în tubul digestiv, care la unele insecte conţine o masă compactă de germeni; există însă şi insecte la care este steril, fie pe toată lungimea lui, fie numai în anumite regiuni. În general, repartiţia microflorei în cele trei porţiuni ale intestinului este inegală şi, de asemenea, diferită de la o insectă la alta, în funcţie de anatomia particulară a tubului digestiv. Insectele al căror intestin are o configuraţie foarte variată, caracterizată prin prezenţa unor coecumuri, diverticuli, încolăciri etc., ceea ce creează condiţii de mediu diferenţiate regional, mai ales în ceea ce priveşte *p*H-ul, găzduiesc o mare varietate de microorganisme comparativ cu insectele care au un intestin rectiliniu. Contaminanţii interni mai pot fi localizaţi şi în orificiile genitale, trahee, spiracule, ochi etc.

În unele cazuri, bacteriile pot supravieţui în organismul insectei, pe timpul diferitelor faze ale metamorfozei acesteia, în aşa fel încît insecta adultă este deja contaminată intern în momentul apariţiei ei. Aşa se întîmplă, de exemplu, la *Musca domestica,* la care bacteriile care contaminează larvele se regăsesc în organismul adult. Fenomenul este mult mai frecvent întîlnit la căpuşe, în ceea ce priveşte unele microorganisme patogene pentru om şi animale.

2. MICROORGANISMELE SIMBIOTICE ALE ARTROPODELOR

Numeroase specii de insecte şi căpuşe sînt infectate cu anumite specii de microorganisme (bacterii, levuri sau protozoare), care fără să producă îmbolnăvirea gazdei lor se localizează în corpul ei extra- sau intracelular. De cele mai multe ori, relaţiile dintre partenerii unei asemenea asociaţii sînt *mutual-beneficiale.*

Simbionţi *extracelulari* se întîlnesc în special la termite, la insectele xilofage şi la unele specii de *Heteroptera.* Localizarea lor preferenţială este cea digestivă, cu deosebire, în unele cazuri, la nivelul unor apendice sacciforme numite *coecumuri* sau *cripte* bacteriene, situate la extremitatea distală a intestinului mijlociu. Criptele bacteriene, cu morfologie şi dimensiuni diferite, conţin totdeauna un număr foarte mare de bacterii caracteristice morfologic pentru insecta care le poartă. Faptul că la asemenea insecte restul tubului digestiv este steril a sugerat ipoteza că microorganismele prezente în aceste formaţii ar avea, pe de o parte, un rol important în procesul de digestie, contribuind la nutriţia azotată a gazdei şi la aprovizionarea ei cu factori de creştere, vitamine etc., iar pe de altă parte, ar avea capacitatea de a împiedica dezvoltarea altor microorganisme în organismul insectei.

Simbionţii *intracelulari* sînt cel mai adesea localizaţi în structuri special diferenţiate, numite *micetoame,* care se formează prin gruparea unor celule

Scanned with OKEN Scanner

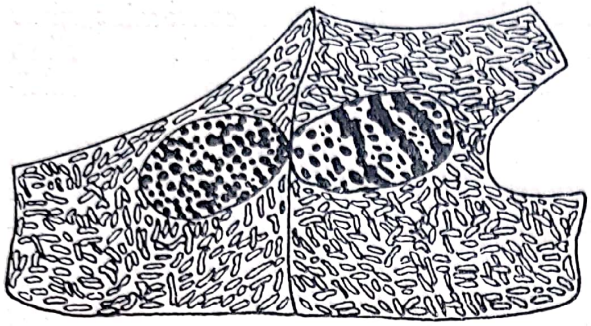


Fig. 407. Bacteriocite de *Blatta orientalis* în interiorul cărora se văd numeroase bacterii simbiotice (după Mercier).

denumite *micetocite*, descrise inițial la afide. Micetocitele — celule mari sau chiar gigante, cu un grad înalt de poliploidie — pot exista uneori și liber, în care caz sînt răspîndite în tot corpul insectei. Simbionții intracelulari au fost descriși în special la *Blatta* sp., *Cimex* sp., *Pediculus* sp. și la numeroși acarieni.

Cu toate că din punct de vedere funcțional micetomul este socotit a fi asemănător cu nodozitățile de pe rădăcinile leguminoaselor, nu se știe exact în acest caz particular de asociație care este în realitate natura relațiilor dintre simbiont și gazdă. Se admite, în general, că microorganismele beneficiază de protecția intracelulară oferită de gazdă, care le pune la adăpost de condițiile defavorabile ale mediului (frig sau căldură excesive, uscăciune, lipsa hranei, radiațiile U.V.). Deși nu este întru totul clar în ce măsură și mai ales în ce mod beneficiază gazda de această convieţuire, se consideră totuși că relația ei cu bacteriile din micetom ar fi de tip simbiotic, deoarece, spre deosebire de ceea ce se petrece într-o asociație cu caracter de parazitism, infecția microbiană este prezentă constant la toți indivizii speciei, iar modificările celulare induse de ea nu au urmări negative asupra organismului gazdei. De altfel, creșterea numerică a microorganismelor este „controlată" de gazdă, astfel încît

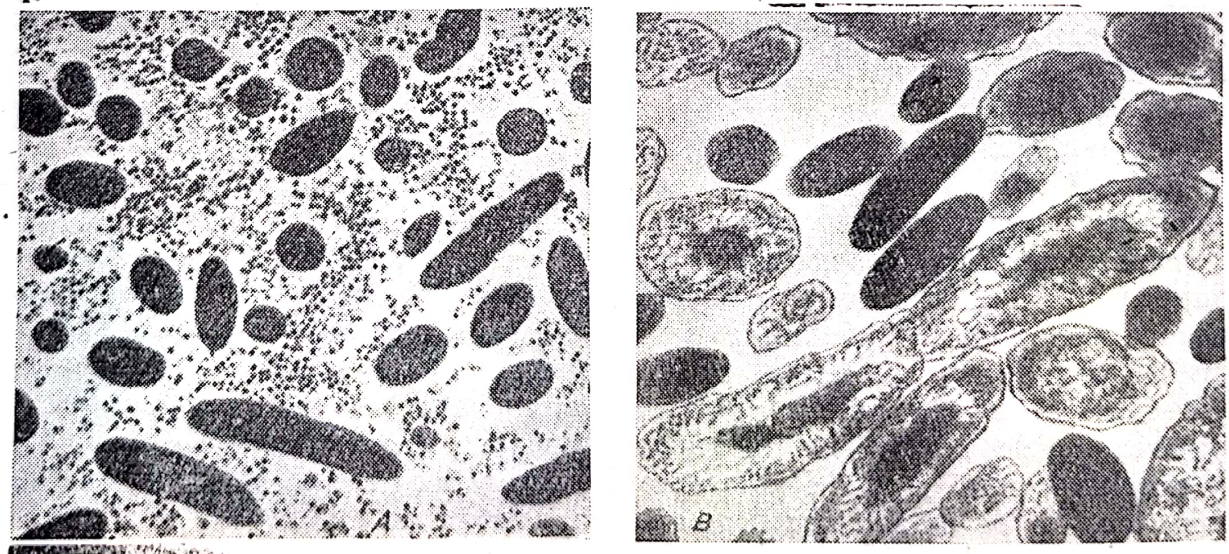


Fig. 408. Bacteroizi din micetomul larvei de *Byrsotria fumigata* colorați intens, alături de granule de glicogen din citoplasma micetocitului *(A)*; bacteroizi în diferite faze de dezvoltare în micetocitul din corpul gras al unei insecte adulte *(B)* (după Mercier).

acestea nu ajung niciodată să se înmulţească atît de mult încît să-i provoace moartea.

În sprijinul caracterului beneficial pentru gazdă a simbiozei ei cu microorganismele din micetom, s-au adus dovezi indirecte, obţinute pe cale experimentală prin eliminarea asociatului microbian. Astfel, după cum a observat Aschner, ablaţia micetomului la *Pediculus humanus* are ca urmare diminuarea capacităţii de hrănire şi de reproducere a insectelor, care private de simbionţii lor trăiesc mai puţin şi, dacă sînt femele, nu mai depun ouă. Întrucît aceste tulburări nu sînt consecutive traumatismului operator, se poate deduce că microorganismele din micetom exercită, la rîndul lor, o acţiune favorabilă asupra gazdei, ceea ce îndreptăţeşte calificarea ca reciproc beneficiale ale relaţiilor de simbioză din această asociaţie. La o concluzie similară au dus experienţele de sterilizare bacteriologică prin antibiotice a altor insecte purtătoare de simbionţi intracelulari. Lipsită precoce de simbionţii ei prin acţiunea antibioticelor, *Blatta orientalis* suferă o întîrziere marcată a procesului de creştere şi maturare în raport cu martorii: insectele astfel sterilizate bacteriologic sînt mai mici, au o culoare mai deschisă şi prezintă semne de avitaminoză, chiar dacă sînt hrănite pe medii îmbogăţite cu substanţe nutritive. La *Berberus cranifer*, administrarea de penicilină, care opreşte multiplicarea microorganismelor simbiotice sau chiar le omoară, determină şi moartea insectei în cîteva zile de la începerea tratamentului.

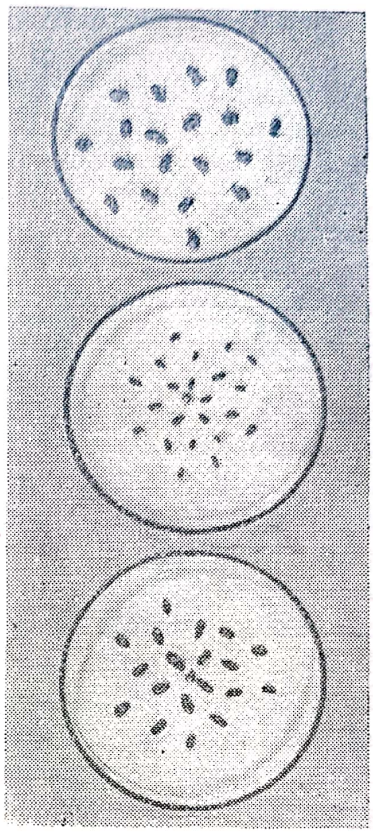


Fig. 409. Influenţa microorganismelor simbiotice asupra dezvoltării la *Blatella germanica: sus* — insecte normale; *mijloc* — insecte incapabile de creştere după înlăturarea simbionţilor prin tratare cu aureomicină; *jos* — insecte subdezvoltate, hrănite cu celule de drojdie (după Brooks).

Microorganismele simbionte intracelulare ar îndeplini deci roluri multiple în organismul artropodului-gazdă, contribuind la nutriţia lui azotată, în special dacă acesta aparţine unei specii hematofage, aprovizionîndu-l cu diferite vitamine în concentraţii reglate adecvat şi influenţînd pe această cale metabolismul lui intermediar.

3. ROLUL MICROORGANISMELOR NEPATOGENE ÎN VIAŢA ARTROPODELOR

Cunoştinţele referitoare la rolul microorganismelor care se dezvoltă în mod normal în organismul artropodelor sau care trăiesc asociate cu ele într-un mediu comun sînt relativ puţine. Cu toate acestea există o serie de fapte de observaţie şi de date experimentale care arată în mod neîndoielnic că microorganismele joacă un rol important în fiziologia insectelor.

1) *Microorganismele ca sursă de vitamine şi de stimulatori de creştere.* Hobson a arătat că larvele muştei de carne, *Lucilia sericata,* nu se dezvoltă în condiţii aseptice (pe medii cu sînge steril), datorită, probabil, lipsei factorilor de creştere din grupul vitaminei B. Dezvoltarea larvelor se face însă în bune condiţii dacă mediul este infectat cu diferite bacterii izolate din intestin ori de pe carne alterată, sau dacă i se adaugă autolizat de drojdie. Experienţe ulterioare au confirmat această observaţie demonstrînd că, în general, creşterea larvelor este posibilă pe medii sterile numai în prezenţa tuturor factorilor nutritivi care le sînt necesari. Dacă prin compoziţia sa mediul este deficitar în această privinţă, adăugarea de bacterii sau levuri suplineşte lipsa factorilor de creştere esenţiali.

2) *Microorganismele ca factor nutritiv.* Încă în 1906, Bogdanov observă că prezenţa bacteriilor în mediu este absolut necesară pentru evoluţia unor larve ca, de exemplu, aceea de *Calliphora vomitoria,* care nu se dezvoltă în lipsa acestor microorganisme. Ulterior, Bacot a presupus că larvele de ţînţar se hrănesc cu bacterii. El aducea ca argument principal faptul că aceste larve clarifică apa încărcată cu bacterii în care cresc, conţinutul lor intestinal rămînînd însă foarte sărac în germeni, întrucît bacteriile ingerate din apă ar fi în cea mai mare parte digerate. S-a demonstrat, de asemenea, că cele mai bune condiţii pentru dezvoltarea larvelor de *Culex quinquefasciatus* şi *Aedes aegypti* se realizează atunci cînd în mediu există asociaţii de bacterii şi alge sau de bacterii şi infuzori şi că, pe de altă parte, chiar fiecare dintre aceste grupe de microorganisme luate izolat le asigură, de asemenea, o bună dezvoltare. Larvele de ţînţar nu se dezvoltă în apă sterilizată, chiar dacă ea provine din locurile lor normale de creştere, în timp ce infectarea ei cu diferite bacterii permite dezvoltarea normală a acestor larve. După datele lui Rozeboom, larvele de ţînţar nu pot folosi ca hrană orice fel de bacterii, ci în special pe acelea prezente în locurile lor naturale de creştere. În condiţii de laborator, bacteriile cele mai utile din acest punct de vedere s-au dovedit a fi *B. subtilis, B. mycoides, Aerobacter aerogenes* şi *Pseudomonas fluorescens.* După alţi autori, creşterea larvelor ar fi dependentă de factorii de creştere furnizaţi de bacterii, prezenţa microorganismelor nefiind însă absolut esenţială dacă aceşti factori se găsesc ca atare în mediu.

3) *Microorganismele ca sursă de enzime.* Microorganismele intestinale ale artropodelor produc cantităţi însemnate de enzime proteolitice, lipolitice şi amilolitice, care, eliminate în tubul digestiv al gazdei lor, exercită fără îndoială un rol important în procesele de digestie. Observaţiile cele mai amănunţite au fost făcute pe musca fructului de măslin *(Dacus oleae),* care se hrăneşte cu cantităţi mari de grăsimi şi în al cărei intestin, în porţiunea lui cecală, se găsesc constant bacterii care produc lipază. De asemenea, se consideră că cele mai multe dintre enzimele zaharolitice ale albinelor sînt de origine microbiană. În ceea ce priveşte digestia celulozei, la majoritatea insectelor fitofage hrana trece atît de repede prin intestin, încît este exclusă posibilitatea unei intervenţii a microflorei celulozolitice care acţionează lent. Totuşi, la unele dintre aceste insecte există diverticuli speciali — *camerele de fermentaţii* — în care

bacteriile descompun celuloza și din care produșii de digestie difuzează în intestin.

Pe de altă parte, bacterii, levuri și mucegaiuri din mediul în care își depun ouăle unele specii de artropode elaborează diferite enzime proteolitice care stimulează procesul de eclozare a ouălor de artropode. Efectul stimulator al enzimelor microbiene depinde și de starea ouălor respective. În experiențele lui Rozeboom, din 240 de ouă uscate de *Aedes aegypti*, numai 4 au eclozat în apă sterilă, iar după inocularea mediului cu bacterii, dintr-un lot egal au eclozat în timp de două zile 204 ouă. În condiții similare, ouăle proaspete, umede au dat un procent de 35% ecloziuni în apă sterilă și 82% în apă care conținea bacterii. Stimularea ecloziunii poate fi produsă de mai multe specii de microorganisme ca *E. coli, Sarcina lutea, Pseudomonas aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus niger, Penicillium* sp. și *Fusarium* sp. (cel puțin în ce privește ouăle speciilor de *Aedes*).

4) *Microorganismele ca agenți care modifică avantajos mediul abiotic.* Microorganismele care trăiesc libere în bălțile naturale și care se înmulțesc intens primăvara în urma creșterii temperaturii, determină — în special în această perioadă a anului — o scădere a concentrației sau chiar epuizarea oxigenului dizolvat, favorizînd astfel eclozarea ouălor de țînțari depuse în aceste ape stagnante. Activitatea microorganismelor poate de asemenea să modifice unele substraturi în așa fel încît să le facă accesibile ca surse de nutriție pentru artropode: termitele și insectele xilofage consumă în special lemnul pe care s-au dezvoltat diferite specii de fungi, iar larvele de *Drosophila* găsesc condiții favorabile de nutriție în mustul de strugure fermentat de drojdiile din genul *Saccharomyces*. În sfîrșit, numeroase microorganisme saprofite (bacterii și fungi) degradează substanțele organice complexe la compuși simpli (acizi organici, polipeptide etc.), folosiți ca hrană de unele insecte, și produc diferite substanțe volatile care atrag prin mirosul lor adulții diferitelor specii de *Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera,* aflați în căutarea de hrană și de locuri potrivite pentru depunerea ouălor în condiții favorabile incubării și eclozării lor.

4. BOLILE PRODUSE INSECTELOR DE CĂTRE MICROORGANISMELE PATOGENE

Virozele insectelor. Virusurile produc trei tipuri de boli ale insectelor: *1) poliedroze,* caracterizate prin prezența în țesuturile infectate a unui număr mare de cristale proteice poliedrice în care sînt incluse particulele virale; *2) granuloze,* în care țesuturile infectate sînt pline cu cristale foarte mici sau cu granule care conțin cîte o singură particulă virală; *3)* boli în care virusul persistă liber în țesuturi, neacoperit de formații cristaline, așa cum este, de exemplu, „boala irizantă" a dipterului *Tipula paludosa,* produsă de virusul denumit *Tipula iridescent virus.*

Poliedrozele nucleare, descrise la larvele de *Lepidoptera, Hymenoptera* și *Diptera* sînt determinate de virusuri în formă de bastonașe, care se înmulțesc în nucleul celulei-gazdă. Virusul atacă în special tegumentele, traheea și celulele sanguine. La cîteva zile de la infecție, în nucleii celulelor infectate apar mici

incluzii care cresc ca mărime şi ca număr (10—100 de poliedre într-un nucleu). După distrugerea nucleului virusul trece în citoplasma care este distrusă, la rîndul ei, eliberînd poliedrele care ajung astfel în hemolimfă. Poliedrele sînt cristale de proteină (g.m. $3 \cdot 10^5$), formate de celulă sub controlul genomului viral; ele sînt alcătuite din subunităţi cu g.m. $2 \cdot 10^4$, care conţin inclavaţi în interiorul lor virionii dispuşi izolat sau în mici grupuri. Ţesuturile atacate devin fragile şi se dezintegrează, iar conţinutul lichefiat al corpului insectei, constînd în special din cristale poliedrice, este răspîndit pe plante, ceea ce favorizează diseminarea virusului.

Poliedrozele citoplasmatice sînt determinate de virusuri aproximativ sferice, care se înmulţesc în citoplasmă. Boala se manifestă printr-o întîrziere în creşterea larvelor care încetează să se hrănească şi, eventual, mor.

Granulozele produc la lepidoptere boli similare poliedrozelor nucleare, cu invadarea tegumentelor şi dezintegrarea lor, urmată — de astă dată — de liberarea a cîtorva milioane de „granule", incluzii ovale de proteină de 200×500 mμ, conţinînd fiecare cîte un virion.

Bacteriozele insectelor. Insectele pot fi afectate de infecţia cu unele bacterii potenţial sau facultativ patogene ca *Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Clostridium* sp., *Bacillus* sp. Un rol aparte în această privinţă revine bacteriilor sporogene cristalifere din grupul *B. cereus, B. thuringiensis* (v. infra). În sfîrşit, patogenii obligaţi produc boli ca *loca albinelor (B. larvae* şi *B. alvei), flaşeria* viermilor de mătase *(B. cereus* var. *alesti*, sinonim probabil cu *B. bombycis* descris de Pasteur).

Micozele insectelor. Fungii produc infecţii grave ale larvelor de ţînţar (*Coelomyces* sp.) şi ale artropodelor din ordinele *Diptera, homoptera, Hemiptera* şi *Coleoptera* (*Entomophtora* sp.).

Deosebit de importante sînt infecţiile cu *Beauveria bassiana*, care pe lîngă infecţia viermelui de mătase *(muscaridina)* produce boli la numeroase alte insecte.

5. ARTROPODELE CA VECTORI AI MICROORGANISMELOR PATOGENE

Agenţii patogeni ai unor boli infecţioase pot fi transmişi în natură de la un organism infectat la un altul receptiv prin intermediul unui artropod care joacă în acest caz rolul de gazdă intermediară, transmiţător viu sau vector (de la lat. *vehere*=a purta).

Dintre numeroasele specii de artropode cunoscute, cele mai importante pentru transmiterea microorganismelor la om şi la animale sînt cele hematofage, al căror aparat bucal este adaptat pentru înţepat şi supt. Cu foarte rare excepţii, artropodele vectoare tolerează bine prezenţa agenţilor patogeni în organismul lor, ceea ce constituie în practică un factor agravant în ce priveşte posibilităţile de transmitere a bolii. Această toleranţă a fost interpretată ca fiind rezultatul unui parazitism de durată, la care organismul vector a reuşit să se adapteze în filogeneză. Aşadar, după toate probabilităţile, microorganismele respective au fost iniţial parazite ale artropodelor de la care, ulterior, au trecut la animale şi la om.

În raport cu relațiile dintre microorganisme și vectori, transmiterea agenților patogeni de către artropode se face pe două căi principale: mecanică și biologică.

1) *Transmiterea mecanică* este caracterizată prin aceea că agentul patogen nu suferă nici o modificare în organismul vectorului, nici ca număr de indivizi și nici ca ciclu de dezvoltare. În acest caz, artropodul nu reprezintă o gazdă intermediară obligatorie pentru microorganismele patogene, deoarece realizarea integrală a ciclului vital, ca și multiplicarea acestora, pot avea loc și în afara organismului vectorului. În funcție de modul în care vectorul transportă microorganismele la suprafața corpului sau în interiorul lui, transmiterea mecanică a agenților patogeni poate fi externă sau internă.

Transmiterea mecanică *externă* a agenților patogeni este frecvent întîlnită la insecte ca musca de casă și, în mai mică măsură gîndacul — insecte care se înmulțesc și se hrănesc pe excrete, după care trec să se hrănească pe diferite alimente folosite de om. Aceste insecte pot purta pe suprafața corpului (în special pe picioare și pe aripi) diferite bacterii patogene ca *Salmonella typhi, S. paratyphi, V. cholerae, Shigella dysenteriae,* pe care le transportă dintr-un loc în altul, transmițînd organismelor receptive bolile corespunzătoare (febra tifoidă, febrele paratifoide, holera, dizenteria).

În cazul transmiterii mecanice *interne,* microorganismele se găsesc temporar în organismul insectei, traversînd ca atare tubul digestiv, de unde pot fi eliminate — pe alimente, în apă sau pe mucoase — prin regurgitare, prin depunerea excretelor sau prin strivirea corpului insectei. Astfel, muștele *Phormia regina* și *Phaenicia sericata,* fără a fi gazde specifice pentru virusul poliomielitei și virusurile Coxsackie, le ingeră din diferite excrete și le elimină timp de mai multe zile, putînd astfel contamina diferite alimente. Transmisiunea mecanică internă poate fi realizată și prin înțepătură, în cazul artropodelor hematofage care transportă agenții patogeni de la o gazdă la alta prin intermediul trompei contaminate sau printr-un mecanism similar inocularii cu seringa. Acest ultim tip de transmitere este curent la insectele din familia *Tabanidae,* care, silite să-și întrerupă suptul din cauza mișcărilor de apărare ale gazdei înțepate (de exemplu, un animal bolnav de cărbune), și-l continuă trecînd pe o gazdă nouă, căreia îi inoculează agentul patogen (în cazul de față *B. anthracis*), luat o dată cu sîngele de la animalul bolnav.

2) *Transmiterea biologică* se realizează printr-un mecanism mai complicat, deoarece în acest caz agenții patogeni parcurg o parte din ciclul lor de viață în organismul uman sau animal și o altă parte în acela al vectorului. Atunci cînd transmiterea biologică este simplă, sau de tip propagativ, microorganismul se multiplică foarte mult în corpul insectei, fără a suferi modificările morfologice și biologice corespunzătoare unei faze a ciclului de evoluție. De exemplu, *Rickettsia prowazeki,* agentul patogen al tifosului exantematic, se înmulțește intens în păduchele de corp *(Pediculus corporis),* iar *Pasteurella pestis,* agentul patogen al ciumei, în puricele de șobolan, *Xenopsylla cheopis.* Alteori, transmiterea biologică este de tip ciclopropagativ, caracterizat prin aceea că microorganismul suferă modificări legate de ciclul său de dezvoltare și, în același timp, se multiplică în organismul vectorului. Ea este tipică în cazul sporozoa-

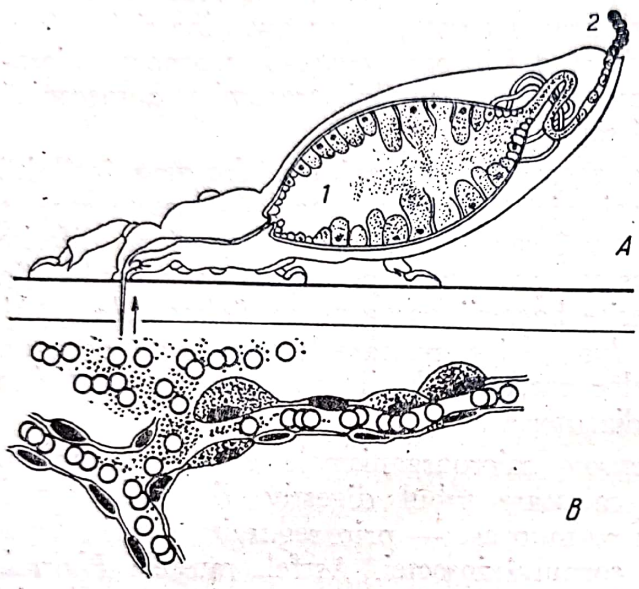


Fig. 410. Evoluţia infecţiei cu *Rickettsia prowazekii* la păduchele de corp:
A — infectarea prin hrănire pe un bolnav; înmulţirea rickettsiilor în celulele tubului digestiv al artropodului şi eliberarea lor în lumenul intestinal *(1)* sînt urmate de depunerea lor pe piele odată cu dejecţiile artropodului *(2)* în momentul în care acesta se hrăneşte pe un alt organism; *B* — capilar sanguin cu endoteliile parazitate de rickettsii.

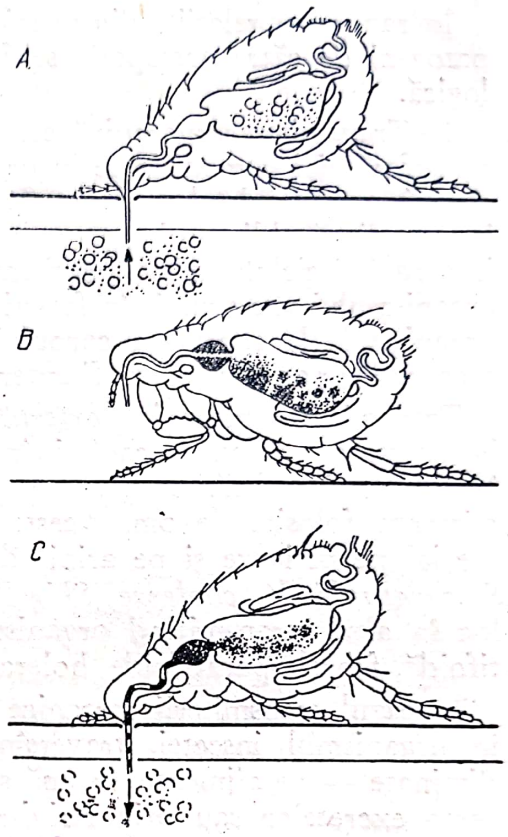


Fig. 411. Evoluţia infecţiei cu *Pasteurella pestis* la purecele de şobolan *Xenopsylla cheopis:*
A — infectarea purecelui prin hrănire pe un animal bolnav; *B* — multiplicarea bacteriilor în tubul digestiv cu obstruarea proventriculului; *C* — infectarea unui organism uman normal prin ruperea „dopului" bacterian şi regurgitarea fragmentelor contaminante în plagă.

rului *Plasmodium malariae*, agentul patogen al paludismului, al cărui ciclu asexuat are loc în organismul uman, iar cel sexuat (sporogonic) în stomacul femelei de *Anopheles* sp.

Mecanismul de transmisiune este diferit după locul multiplicării agentului patogen în vector şi biologia acestuia. Ingerată o dată cu sîngele supt de la un bolnav, *R. prowazeki*, agentul patogen al tifosului exantematic, se localizează la păduche în celulele epiteliale ale tubului digestiv, care în momentul în care sînt intens parazitate se desprind şi se dezintegrează, liberînd rickettsiile în conţinutul intestinal. În timpul unui nou „prînz" sanguin păduchele poate să-şi depună dejecţiile contaminate pe pielea unui om sănătos. La iritaţia produsă de înţepătura păduchelui, omul reacţionează prin scărpinat, introducîndu-şi astfel singur rickettsiile în sînge prin plaga minusculă produsă de înţepătură sau prin leziunile de grataj. La puricele infectat tot prin supt, cu *P. pestis*, multiplicarea bacteriei care provoacă ciuma blochează proventriculul şi astfel puricele nu se mai poate hrăni. Cu ocazia unei noi înţepături, efortul de

sugere face să se rupă cheagul bacterian, ale cărui fragmente sînt regurgitate în plaga produsă prin înţepare. Agentul patogen al febrei recurente de păduche — *Borrelia recurrentis* — este localizat în cavitatea generală, în picioarele şi în antenele păduchelui. Eliberarea lui pe piele nu este deci posibilă decît prin strivirea artropodului. În sfîrşit, agentul patogen al paludismului este localizat în glandele salivare *(gs)* ale anofelului, de unde poate trece în organismul uman prin înţepătura ţînţarului urmată de regurgitarea salivei lui contaminate.

În unele cazuri, între agenţii patogeni (virusuri, rickettsii, bacterii) şi artropodele vectoare se stabileşte o interrelaţie specifică, avînd un caracter de parazitism bine tolerat, caracterizat prin aceea că agentul patogen este transmis *transstadial* (menţinîndu-se în cursul metamorfozei pînă la stadiul de adult la artropodele care fuseseră infectate în stadiul de larvă), sau chiar *transovarian* şi transstadial. În aceste cazuri de o importanţă practică excepţională, artropodele nu sînt numai transmiţători de agenţi patogeni în natură, ci adevărate izvoare de infecţie, cu un rol infinit mai mare decît izvorul de infecţie animală (E. N. Pavlovski). Transmiterea transovariană de la o generaţie la alta se întîlneşte numai la artropodele cu o metamorfoză incompletă, aşa cum sînt căpuşele (*Ornithodorus* sp., *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp.), care propagă boli ca febra recurentă de căpuşe, tularemia, febra butonoasă, encefalitele etc. Acest mod de transmitere a agentului patogen ar fi imposibil la insectele care trec prin metamorfoză completă, probabil din cauza fagocitozei active în faza de pupă.

Prin mecanisme similare celor descrise pentru microorganismele zoopatogene, unele artropode pot transmite în natură diferite microorganisme patogene

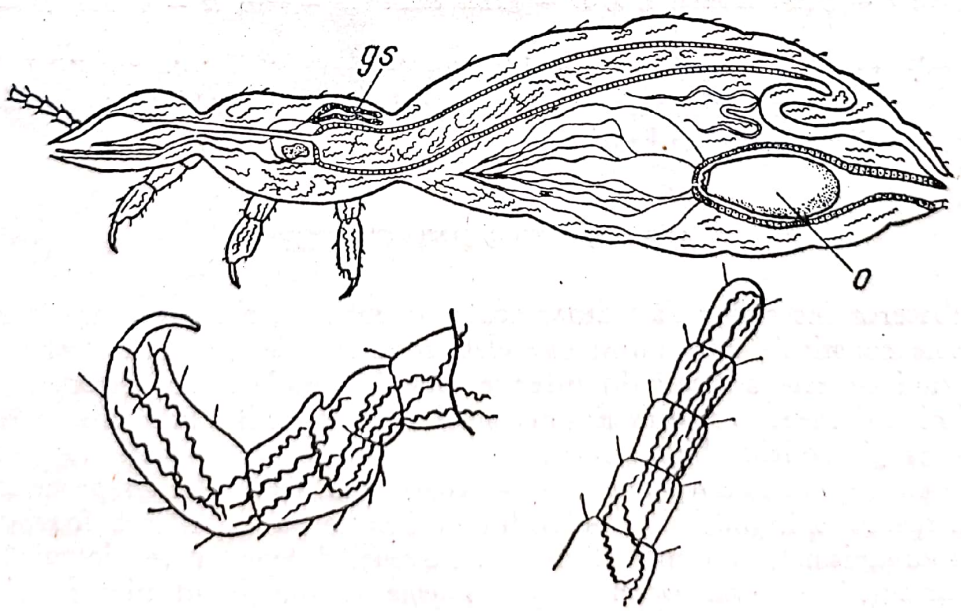


Fig. 412. Dezvoltarea bacteriei *Borrelia recurrentis* în picioarele şi antenele păduchelui de corp, care se rup uşor, permiţînd depunerea agentului patogen pe piele şi transmiterea infecţiei la om.

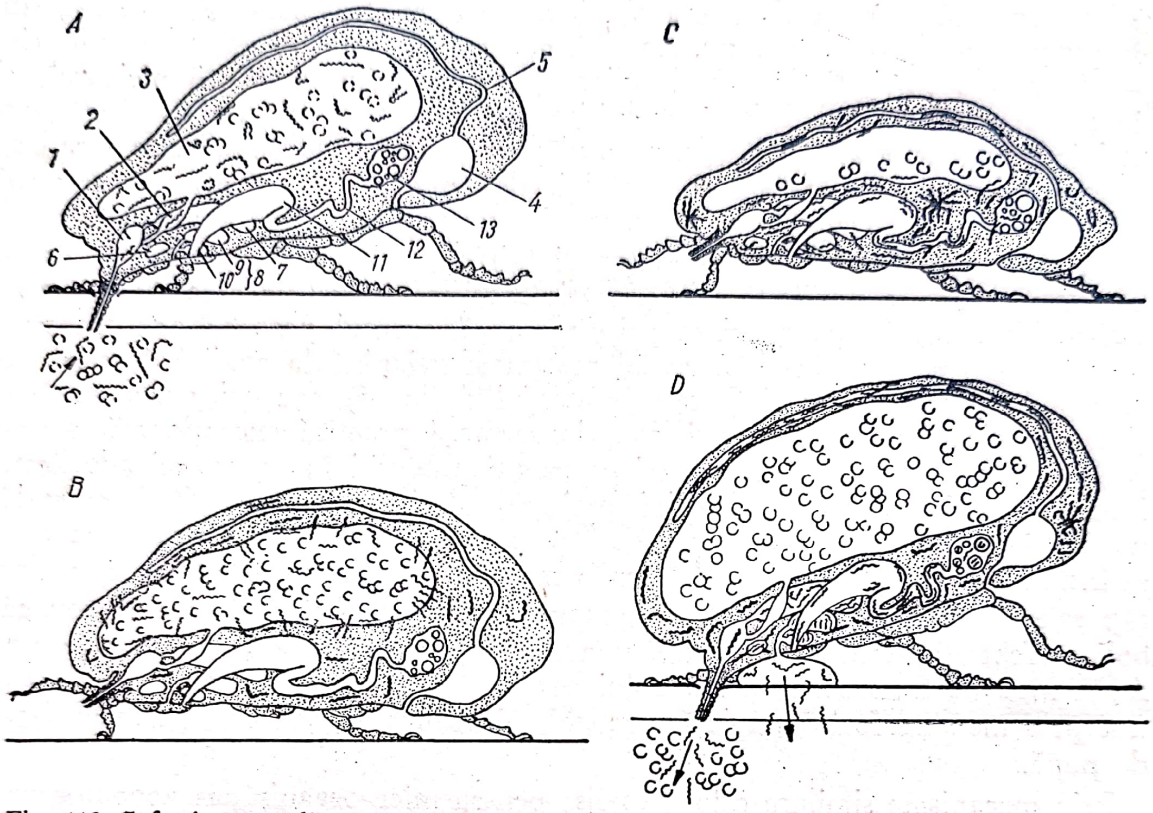


Fig. 413. Infecţia generalizată cu *Borrelia duttonii* la căpuşe (*A, B, C, D*) şi localizarea ovariană explică transmiterea ereditară la descendenţi:

1 — faringe; *2* — stomac; *3* — cecum gastric; *4* — ampula rectală; *5* — tub Malpighi; *6* — ganglioni subesofagieni; *7* — glandă salivară; *8, 9, 10* — glande coxale; *11* — uter; *12* — oviduct; *13* — ovar.

pentru plante. O importanţă deosebită au în această privinţă afidele, vectori a numeroase virusuri fitopatogene pe care le inoculează prin înţeparea plantelor cu ale căror sucuri se hrănesc.

6. BACTERIILE „INSECTICIDE"

Combaterea insectelor dăunătoare cu ajutorul bacteriilor sau al altor microorganisme constituie una dintre metodele moderne de protecţie a plantelor. În ultimii ani ea este aplicată în diferite ţări, în asociaţie cu metodele chimice, agrotehnice şi mecanice, care rămîn totuşi indispensabile. Bacteriile care pot fi folosite ca „insecticide biologice" se întîlnesc rareori în insectele moarte, deoarece ele nu se pot înmulţi decît într-o gazdă vie. Rolul lor în procesele naturale de reglare a înmulţirii populaţiilor de insecte pare a fi însă foarte limitat.

Microorganismele cele mai eficiente ca agenţi de combatere biologică a dăunătorilor sînt în general *bacteriile entomogene* — aparţinînd microflorei proprii a insectelor — şi cu deosebire speciile sporogene din acest grup, mai rezistente în condiţii defavorabile de mediu şi mai uşor de manipulat. În practică se utilizează în special patru tipuri de *Bacillus cereus* (*B. thuringiensis, B. cereus*

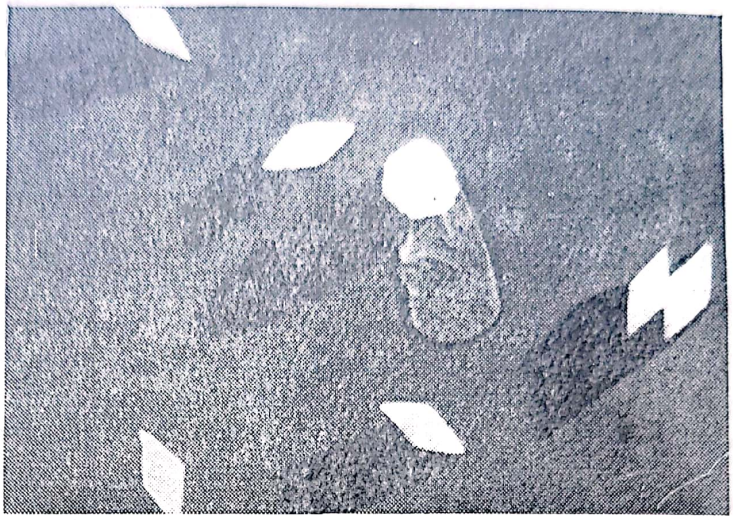


Fig. 414. Cristale libere şi spor de *Bacillus Thuringiensis* înconjurat de exospor (după Hannay).

var. *sotto*, *B. cereus* var. *alesti*, *B. cereus* var. *galleriae)*, precum şi varietatea *entomocidus* a speciei *B. entomocidus*. Ele pot servi la combaterea unor lepidoptere dăunătoare, care sînt sensibile la infecţie numai în stadiul lor larvar, deoarece numai organismul larvelor oferă condiţii favorabile pentru germinarea sporilor şi multiplicarea bacteriilor respective. *B. thuringiensis*, de exemplu, poate infecta larvele a aproximativ 80 de specii de lepidoptere din genurile *Colias*, *Pieris*, *Protoparce*, *Vanessa*, *Trichoptusia*, *Plutela*, *Pyrausta* etc.

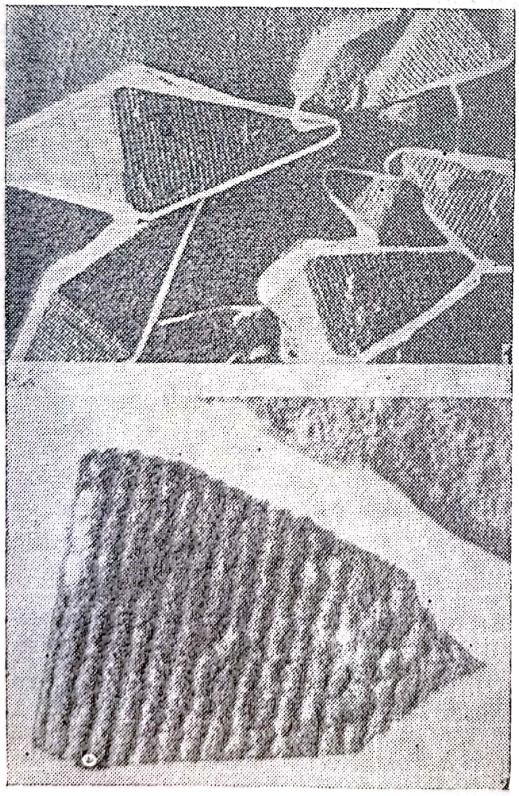


Fig. 415. Cristale de *B. thuringiensis* alcătuite din şiruri ordonate de unităţi sferice (*1*) şi detaliu de structură evidenţiind unităţile sferice de natură proteică (2) (după Vanková).

Din bacteriile entomocide, care se pot izola din natură numai de la larvele infectate se fac în laborator culturi abundente care se răspîndesc prin pulverizare în fază lichidă sau sub formă de pulbere în zonele populate cu lepidoptere dăunătoare.

Mecanismul acţunii „insecticide" este determinat atît de biologia bacteriilor, cît şi de natura, particularităţile biologice şi proprietăţile biochimice ale larvei.

Bacteriile entomogene sporogene sînt caracterizate prin prezenţa unor incluzii citoplasmatice cristaline de formă romboidală (bipiramidală) şi de natură proteică, denumite *incluzii parasporale*, care se formează în momentul sporulării şi ajung la dimensiuni aproximativ egale acelora ale sporului. Pe microelectrono-

grafii suprafaţa incluziilor apare formată din şiruri regulate de molecule de proteină sferice cu Ø de 87 Å. Proteina foarte toxică din care sînt alcătuite cristalele este solubilă numai în mediu alcalin, la *p*H 12, ceea ce explică de ce activitatea insecticidă a acestor bacterii se exercită aproape exclusiv asupra larvelor de lepidoptere, al căror conţinut intestinal este intens alcalin. Amestecul de spori şi cristale parasporale ingerat de larvă, dintr-o zonă în care s-au pulverizat culturi de bacterii cristalifere, găseşte în intestinul larvar condiţii favorabile de acţiune. Proteina toxică a cristalelor parasporale se dizolvă în mediul intestinal cu reacţie alcalină şi atacă substanţa interstiţială care cimentează celulele din structura peretelui intestinal, astfel că lichidul foarte alcalin din intestin poate difuza uşor în hemolimfă. Pe de altă parte, sporii bacteriei germinează, iniţial lent, iar formele vegetative rezultate traversează epiteliul intestinal lezat prin acţiuni toxice şi trec, la rîndul lor, în hemolimfă, unde se multiplică foarte rapid. Ca urmare, larvele infectate încetează să se mai hrănească şi mor de paralizie intestinală de natură toxică, sau de manifestări paralitice generale, consecutive creşterii alcalinităţii hemolimfei şi invaziei bacteriene masive. Efectul letal poate, aşadar, să fie determinat fie exclusiv de acţiunea toxică a proteinei cristalelor parasporale, fie de asocierea acestei acţiuni cu aceea a altor toxine bacteriene sau cu bacteriemia.

Acţiunea toxică a bacteriilor cristalifere este foarte specifică şi, ca atare, prezenţa lor nu implică pericol nici pentru insectele utile (entomofage, albine ş. a.) şi nici pentru plante, om şi animale, ceea ce face ca, spre deosebire de insecticidele chimice (DDT, hexaciclohexan etc.), aceste bacterii să poată fi răspîndite în natură fără precauţii speciale.

Combaterea insectelor dăunătoare cu ajutorul microorganismelor entomopatogene este utilă mai ales pentru protecţia pădurilor. În ţara noastră se utilizează preparatul biologic *Entomobacterin*, constînd dintr-o cultură mixtă de *B. cereus* var. *galleriae* şi *B. thuringiensis*. Acest preparat s-a dovedit eficient împotriva omizilor de *Malacosoma neustria, Hyphantria cunea, Aporia crataegi, Hyponomeuta mahalebella, Y. malinella* şi *cognatella*, la care provoacă o mortalitate maximă după 5—8 zile, infecţiozitatea lui menţinîndu-se timp de 10 zile de la pulverizare.

ELEMENTE DE MICROBIOLOGIA SOLULUI

Microbiologia solului, una dintre ramurile aplicative ale microbiologiei generale, *este ştiinţa care studiază microorganismele care trăiesc în sol*, ale căror manifestări biologice sînt determinate de particularităţile acestuia şi care contribuie prin activitatea lor vitală la determinarea însuşirilor solului respectiv.

Primele preocupări ştiinţifice legate de microorganismele din sol datează din anul 1865, cînd Pasteur presupune că *nitrificarea* ar fi un proces de natură bacteriană. Voronin, în 1866, emite ipoteza originii vii a „bastonaşelor" din nodozităţile de lupin, ipoteză confirmată în 1888 de Hellriegel şi Willfarth.

Rolul microorganismelor în diferite procese din sol a fost demonstrat de rezultatele cercetărilor lui Kostâcev, Ivanovski, Beijerinck ş.a. O contribuţie cu totul deosebită — constituirea ştiinţei microbiologice a solului — a adus-o însă S. N. Winogradsky (1856—1953) prin lucrările sale referitoare la procesul de nitrificare, la procesele de chimiosinteză şi fixarea biologică anaerobă a azotului atmosferic.

Solul ca mediu natural de trai al microorganismelor

Prin *sol* se înţelege „stratul superficial afînat al litosferei, care îndelung şi continuu transformat prin acţiunea formaţiilor vegetale succesive, a agenţilor atmosferici şi a altor factori naturali, în condiţii caracteristice mediului geografic din care face parte, a acumulat treptat elementele însuşirii specifice numită *fertilitate*, devenind astfel capabil să întreţină viaţa plantelor superioare" (Chirţă, 1955). Astfel definit, solul reprezintă un *sistem coloidobiologic* populat de un număr imens de microorganisme foarte diferite, care prin compoziţia şi structura sa permite dezvoltarea plantelor verzi. Solul îşi are originea în rocile sterile de pe suprafaţa litosferei, care supuse unor procese complexe şi îndelungate de natură fizică, chimică şi biologică s-au transformat într-un strat relativ uniform de material înzestrat cu o proprietate nouă, esenţială — fertilitatea. În procesul de transformare în sol a materialului originar mineral care formează roca-mamă, microorganismele joacă un rol esenţial prin funcţia lor de sinteză şi acumulare a substanţelor organice. Caracteristicile fundamentale ale solului care asigură fertilitatea sînt, pe de o parte, capacitatea sa de a primi şi reţine apa, iar pe de altă parte, conţinutul lui ridicat în substanţe nutritive accesibile plantelor.

1. MICROPOPULAŢIA SOLULUI

Micropopulaţia solului este formată din *microfloră* şi *microfaună*, adică din reprezentanţii microscopici ai lumii vegetale şi ai celei animale. Numărul microorganismelor din sol variază cantitativ şi calitativ în funcţie de tipul de sol,

de *p*H-ul şi aeraţia lui, de vegetaţia şi de condiţiile climatice locale, el putînd oscila de la cîteva sute de mii de organisme la cîteva milioane sau chiar milliarde/gram, ceea ce ponderal poate reprezenta între 2,5 şi 10 tone la hectar. Importanţa lor în sol este uşor de înţeles dacă ne gîndim că acest număr imens de microorganisme nu se găsesc în stare de repaus, ci cresc, se înmulţesc, descompun diferite substanţe şi sintetizează altele, într-un ritm neîntîlnit la alte fiinţe vii.

Microflora solului este alcătuită, după W i n o g r a d s k y, din două categorii de microorganisme, alcătuind, pe de o parte, microflora *permanentă*, iar pe de altă parte, microflora *temporară*.

Microflora permanentă (constantă, autohtonă sau normală) a unui sol este formată din microorganismele caracteristice unui anumit tip de sol, care sînt adaptate la viaţa în „solul normal", adică în solul care nu conţine materii organice în curs de fermentaţie sau de putrefacţie, ci substanţe aduse într-o stare relativ stabilă, aşa cum sînt substanţele humice.

Microflora temporară (zimogenă) este constituită din microorganismele prezente în sol ca urmare a tratării agrotehnice (în cazul adăugării unor îngrăşăminte animale, ca gunoiul de grajd, microflora proprie acestui îngrăşămînt). Microflora temporară se înmulţeşte în sol cînd acesta primeşte diferite substanţe nutritive organice şi dispare treptat, pe măsură ce substanţele respective sînt descompuse. Acestor microorganisme li se adaugă uneori o *microfloră de tranziţie* reprezentată de microorganisme zoo- sau fitopatogene, care însă nu găsesc în sol condiţii de multiplicare, ci numai de supravieţuire temporară în funcţie de factorii de mediu şi de eventualitatea întîlnirii cu specia-gazdă, precum şi microorganisme introduse în mod voit în sol ca stimulatori biologici sub formă de „îngrăşăminte" bacteriene.

Microbiologia solului se ocupă în special de activitatea microorganismelor care reprezintă microflora permanentă, fără a omite însă interrelaţiile lor cu microflora temporară şi participarea acesteia la procesele biologice din sol.

Microflora solului este constituită din virusuri (încadrate convenţional printre componentele microflorei), bacterii, actinomicete, fungi şi alge.

Virusurile din sol sînt reprezentate în special de bacteriofagi şi actinofagi. Frecvenţa şi semnificaţia lor în sol nu sînt bine cunoscute. Iniţial s-a considerat că fagii ar contribui la scăderea numerică a populaţiei bacteriene a solului, rolul lor fiind deci negativ atunci cînd parazitează şi distrug bacterii folositoare pentru fertilitatea solului ca *Azotobacter* şi *Rhizobium*, util atunci cînd acţionează asupra speciilor dăunătoare, cum sînt bacteriile fito- şi zoopatogene. Datele ecologice recente arată însă că în mediile naturale fagii se găsesc în special sub formă de fagi temperaţi, „simbionţi" ai bacteriilor lizogene. Cum trecerea lor spontană sau indusă la forma de fag liber virulent se face cu frecvenţă foarte mică, acţiunea lor litică nu poate să aibă realmente o pondere importantă în procesele de diminuare numerică a populaţiilor bacteriene din sol.

Bacteriile sînt microorganismele cele mai abundente în sol. Numărul lor variază între 300 000 şi 95 milioane de bacterii viabile/gram sol (apreciat prin metoda culturilor) şi între 1 şi 5 miliarde de celule vii şi moarte/gram sol

(evaluat prin examenul microscopic direct). Greutatea lor totală pentru o grosime a stratului de sol de 25 cm este apreciată între 500 kg şi 2—3—6 tone/ha. Bacteriile participă la majoritatea proceselor biologice din sol, influenţînd evoluţia, însuşirile şi în special fertilitatea lui.

Actinomicetele se dezvoltă în toate tipurile de sol, chiar în cele aride şi în deşerturi. Ele sînt însă mai frecvente în solurile bogate în substanţe organice, cu umiditate moderată, neutre sau slab alcaline. Numărul lor, variind de la un sol la altul între 100 000 şi 36 milioane de organisme/gram sol este relativ constant pentru acelaşi sol, datorită faptului că este destul de puţin influenţat de variaţiile factorilor de mediu. În condiţii optime, biomasa lor poate ajunge la 700 kg/ha.

Actinomicetele intervin în numeroase procese biologice din sol şi în special în amonificare, în degradarea unor compuşi rezistenţi, cum este, de exemplu, chitina, precum şi în formarea humusului. Unele specii elaborează substanţe antibiotice care contribuie la menţinerea unui anumit echilibru al microflorei solului.

Fungii din sol aparţin în special genurilor *Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium* (care sînt cei mai frecvenţi, reprezentînd 30—50% din populaţia fungică a solului), *Trichoderma, Trichothecium, Alternaria, Fusarium, Cladosporium.* Datorită sensibilităţii lor la lipsa de O_2, fungii trăiesc în special în straturile superficiale, afînate, ale solurilor bine structurate. Ei sînt mai frecvenţi în solurile acide (soluri de pădure şi podzoluri), precum şi în cele umede şi bogate în substanţe organice. Numărul lor oscilează între 8 000 şi sute de mii de organisme/gram sol, iar biomasa este apreciată la 1 000—1 500 kg/ha. Ciupercile microscopice participă la mineralizarea substanţelor organice — prin procese de amonificare şi celulozoliză — la formarea şi degradarea humusului, la constituirea şi menţinerea structurii solului, la degradarea ligninei, precum şi la sinteza unor stimulatori de creştere (gibereline) pentru plantele superioare. Unele specii formează micorize.

Algele trăiesc în special la suprafaţa solului ca organisme autotrofe fotosintetizante, utilizînd azotul din substanţele minerale din sol, C din CO_2 atmosferic şi energia din lumina solară. Prin această acţiune, ele îmbogăţesc straturile superioare ale solului în substanţe organice şi în O_2. Algele care trăiesc în straturile profunde ale solului sînt heterotrofe, nutrindu-se prin descompunerea a diferite substanţe organice. Numărul total al algelor variază de la cîteva mii la cîteva zeci de mii de celule/gram sol. Rolul algelor în fertilizarea solului nu este bine cunoscut. Unele specii din genurile *Nostoc* şi *Anabaena,* care fixează azotul atmosferic, îmbogăţesc conţinutul solurilor în substanţe azotate. Cel mai frecvent se întîlnesc în sol *Cyanophyceae (Nostoc, Anabaena, Oscillatoria* etc.), apoi *Diatomeae (Navicula, Pinnularia, Cymbella)* şi *Chlorophyceae (Chlorococcum, Chlorella, Scenedesmus* ş. a.).

Microfauna solului este formată din protozoare, microorganisme cosmopolite active în solurile umede şi bogate în substanţe organice. În solurile uscate ele sînt prezente sub formă de chişti. Cele mai frecvente sînt flagelatele *(Mastigophora),* reprezentînd 500 000—1 miliard de celule/gram sol şi amoebele, în număr de 100 000—500 000 de celule/gram sol. Biomasa lor este

apreciată la 100—300 kg/ha. Întrucît se hrănesc în special cu bacterii, protozoarele ar reprezenta unul dintre factorii care limitează multiplicarea bacteriilor în sol. În funcţie de natura microorganismelor pe care le digeră, acţiunea lor asupra productivităţii solului poate fi favorabilă sau defavorabilă. Unele protozoare elaborează substanţe stimulatoare ale metabolismului bacterian şi substanţe azotate, care ca atare sau după mineralizare sînt asimilate de plante.

Variaţiile microflorei solului. Microflora totală a solului este supusă unor variaţii provocate de diferite condiţii de mediu, ca: *temperatura, anotimpul, lucrările agricole* etc. Succesiunea anotimpurilor determină variaţii constînd într-o creştere netă a numărului microorganismelor primăvara (în lunile martie-aprilie), în legătură cu încălzirea care urmează frigului de iarnă şi o a doua creştere numerică, mai puţin evidentă, toamna, ca urmare a îmbogăţirii solului în substanţe nutritive prin căderea frunzelor şi moartea plantelor anuale. Numărul microorganismelor este minim iarna şi mai puţin scăzut vara. Variaţiile sezoniere ale microflorei sînt legate în special de modificările de temperatură şi umiditate. Alternanţa sezonieră de umiditate şi uscăciune are o influenţă favorabilă asupra vieţuitoarelor din sol, probabil în legătură cu faptul că desicaţia ar determina modificări fizico-chimcie ale substanţelor organice, care le-ar face mai uşor utilizabile de microorganisme în perioada cu umiditate crescută.

Lucrările agricole au un efect favorabil asupra microflorei solului, datorită faptului că ameliorează aeraţia solului, mai ales în straturile profunde. La cîteva săptămîni după arat, de exemplu, numărul bacteriilor aerobe poate să crească de la cîteva sute de mii la un miliard de celule/gram sol. În afară de aceasta, prin arat şi prin aplicarea celorlalte procedee agrotehnice, resturile vegetale se amestecă şi se repartizează uniform, ceea ce favorizează degradarea lor de către microorganisme şi prin aceasta, dezvoltarea plantelor.

Adăugarea de îngrăşăminte de provenienţă animală (de exemplu, gunoi de grajd) determină, în afară de îmbogăţirea solului în substanţe organice şi minerale, o creştere a microflorei temporare prin aportul de microfloră proprie îngrăşămîntului, care poate reprezenta pînă la 25% din masa totală a acestuia. Această creştere este foarte însemnată şi durează pînă cînd substanţele organice din îngrăşămînt sînt complet metabolizate, iar produşii rezultaţi sînt preluaţi de microflora autohtonă a solului.

Administrarea de îngrăşăminte vegetale aduce numai un aport slab de germeni. Aceste îngrăşăminte suferă un proces de degradare microbiană prin celulozoliză şi amonificare, proces care este cu atît mai rapid cu cît îngrăşămintele provin din plante mai tinere.

Îngrăşămintele minerale (sub formă de azot amoniacal sau de nitraţi) favorizează dezvoltarea microflorei în general, deoarece foarte multe microorganisme din sol le pot folosi ca sursă de azot.

Influenţa culturii vegetale asupra variaţiilor microflorei din sol este de asemenea deosebit de importantă, dat fiind un anumit grad de specificitate a relaţiilor ecologice dintre asociaţia microbiană de rizosferă şi specia plantei superioare corespunzătoare.

2. PROCESE MICROBIENE DIN SOL IMPLICATE ÎN CIRCUITUL AZOTULUI ÎN NATURĂ

a. Fixarea biologică a azotului atmosferic

Introdus artificial în sol sub forma substanţelor fertilizante obţinute pe cale de sinteză chimică, azotul poate fi fixat în acest mediu şi pe cale naturală, şi anume, printre altele, pornind chiar de la azotul molecular din atmosferă, azot care se poate acumula în sol nu numai prin procesele chimice consecutive descărcărilor electrice din atmosferă, ci şi prin activitatea vitală a unor microorganisme. Cantitatea totală de azot fixat anual este apreciată la circa 100 milioane tone, din care 90% este considerată a fi de origine biologică (Donald, 1960). Cum cantităţile de azot asimilabil din sol sînt în general relativ mici, fixarea biologică a azotului molecular (N_2) reprezintă un proces deosebit de important în circulaţia acestui element în natură, deoarece în lipsa unui asemenea mecanism de fixare, continuu în acţiune, rezervele azotate din sol ar fi epuizate prin pierderile determinate de factori fizici sau chimici ori de consumarea lor de către diferite organisme. Natura biologică a fixării N_2 în sol a fost stabilită de Berthelot (1888), care a demonstrat că acest proces nu are loc în solul sterilizat decît cu condiţia adăugării de pămînt nesteril de grădină. Aceasta dovedea că fenomenul de îmbogăţire a solului în N_2 este legat de activitatea vitală a unor organisme care, pentru a-şi satisface exigenţele nutritive, iau substanţele energetice din sol, iar azotul direct din atmosferă, sub formă de element liber.

Ulterior, cultivarea a diferite microorganisme pe medii de cultură lipsite de substanţe azotate dar menţinute într-o atmosferă saturată cu izotopul radioactiv N^{15}, urmată de cercetarea prezenţei acestui izotop şi dozarea lui în celulele microbiene, a arătat că fenomenul fixării N_2 atmosferic este răspîndit mai larg decît se credea iniţial, fiind întîlnit la aproximativ 15 genuri de bacterii heterotrofe şi autotrofe fotosintetizante, actinomicete, drojdii, ciuperci şi alge albastre.

Fixarea biologică a azotului este realizată, pe de o parte, de microorganismele libere, pe cale aerobă sau anaerobă, iar pe de altă parte, de microorganisme simbionte ale unor plante superioare.

Fixarea azotului molecular atmosferic de către microorganisme libere:

— *Fixarea aerobă* a azotului atmosferic a fost studiată iniţial de Beijerinck (1901), care a izolat şi două dintre microorganismele implicate în aceste procese: *Azotobacter chroococcum* şi *A. agilis*, încadrate astăzi în fam. *Azotobacteriaceae* (Bergey, 1957). Microorganismele din această categorie de fixatori de azot au o poziţie sistematică destul de controversată, deoarece prezintă unele asemănări (relativ la dimensiuni, structura celulară, aspectul capsulei, caracterul multistratificat al stratului mucos şi capacitatea fixatoare de azot) cu algele albastre din familia *Chroococaceae*, de care se deosebesc însă prin incapacitatea lor de fotosinteză şi prin prezenţa cililor la formele tinere. Speciile cunoscute astăzi sînt încadrate în trei genuri: *Azotobacter*, *Beijerinckia* şi *Derxia*.

Fig. 416. *Azotobacter chroococcum.* Aspectul unei celule în faza logaritmică de creştere. În citoplasmă se observă ribosomii (*RNP*), nucleul (*NP*) şi globulele de lipide (*FG*) (microelectronografie după Tchan).

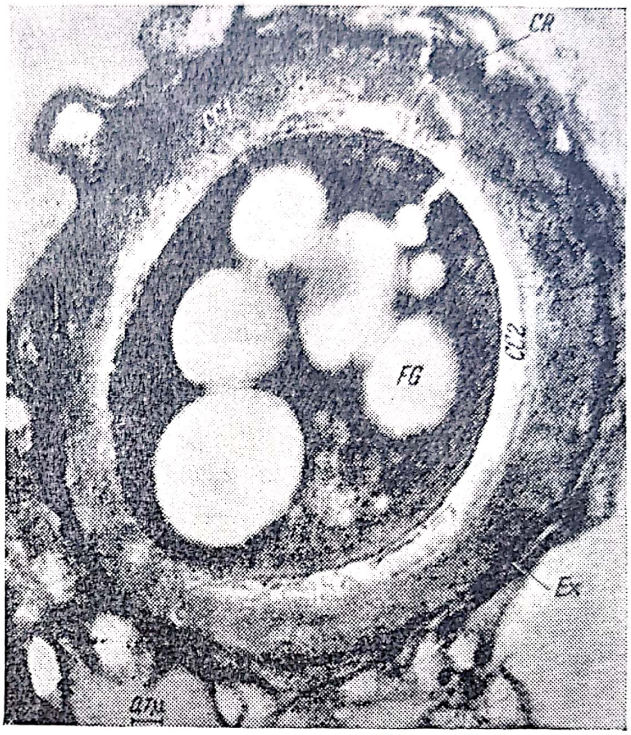


Fig. 417. Chist de *Azotobacter chroococcum.* Se observă o mică fisură (*CR*) în exocistorium (*Ex*) şi cele două straturi ale exinei (CC_1 şi CC_2). Citoplasma conţine mai multe globule lipidice (după Tchan).

În genul *Azotobacter* sînt grupate speciile: *A. chroococcum* (pigment negru insolubil), prezent în ape şi sol; *A. agilis* (pigment verzui), prezent în apele dulci; *A. vinelandii* (pigment galben-verzui), trăind în sol şi în apele dulci; *A. beijerinckii* (pigment galben-brun), frecvent în soluri slab acide şi în ape; *A. insigne* (pigment verde, solubil, cu tendinţă de brunificare), avînd ca habitat apele dulci şi *A. macrocytogenes* (pigment roz, solubil), existent în sol.

Genul *Beijerinckia* reuneşte speciile *B. indica, B. lacticogenes, B. fluminensis, B. derxii* etc., adaptate la condiţiile existente în solurile lateritice, caracteristice regiunilor tropicale, soluri acide, bogate în oxid de fier (*terra rosa*).

Genul *Derxia* are o singură specie — *D. gummosa* — izolată, de asemenea, din regiunile tropicale.

Dintre fixatorii aerobi de azot, cel mai mult studiat este *A. chroococcum,* bacterie Gram negativă cu formă bacilară în stadiile tinere şi cocoidă, sferică sau ovalară în stadiul adult. La maturitate se formează chişti prin contractarea celulei, care se acoperă cu mai multe membrane laxe tristratificate, alcătuind un *exocistorium* cu contur neregulat. Sub acest înveliş periferic se găseşte un alt înveliş, mai gros, bistratificat numit *exină* (T c h a n, 1962, constînd, la rîndul său, dintr-o zonă externă mai densă, cu aspect omogen şi o zonă internă

mai puţin densă. Celula inclusă în interiorul acestor învelişuri conţine numeroase globule de grăsime, dar în rest are aceleaşi particularităţi structurale ca şi celula vegetativă din care provine, încît chistul poate fi considerat ca o celulă vegetativă acoperită de un perete gros. Chistul este forma de latenţă şi de rezistenţă a bacteriei: el se menţine viabil luni şi chiar ani de zile şi, în condiţii favorabile, germinează dînd naştere unei celule tinere.

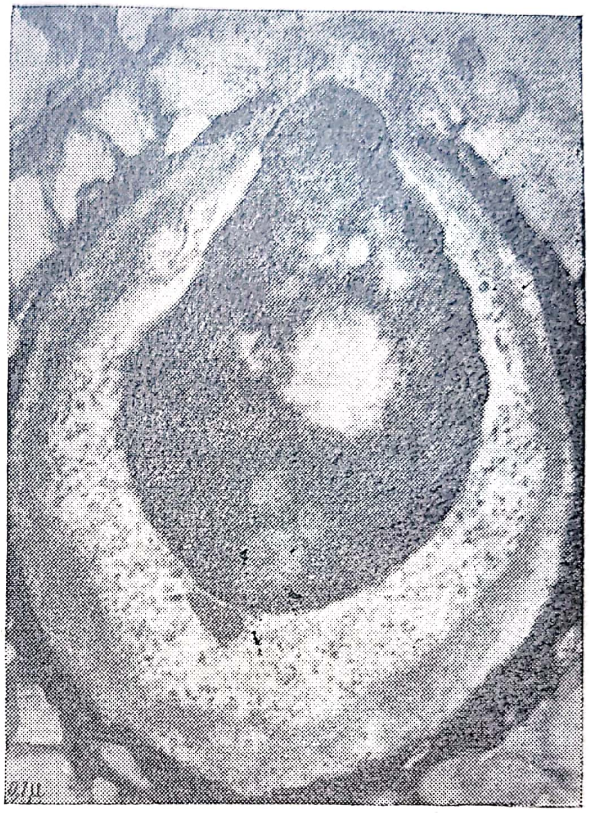


Fig. 418. Secţiune printr-un chist de *A. chroococcum* în curs de germinare (microelectronografie după Tchan).

A. chrococcum se dezvoltă pe medii lipsite de azot, care conţin numai o sursă organică de energie şi carbon, şi anume zaharuri (glucoză, zaharoză), poliozide (amidon, dextrine) sau alcooli (glicerină, etanol, butanol, manitol, sorbitol etc.). În sol, aceste substanţe se acumulează în urma degradării resturilor vegetale şi animale de către microorganismele heterotrofe şi sînt folosite de fixatorul de azot, în special după ce rezervele de azot din sol au fost epuizate de microflora heterotrofă asociată. *Azotobacter* este aerob şi facultativ microaerofil; se dezvoltă între 9 şi 35°C (optim 28°) şi cu predilecţie în solurile umede; zona de *p*H tolerată este cuprinsă între limitele de *p*H 5,8 şi 8,5 (cu *p*H optim 7,6).

— *Fixarea anaerobă* a azotului atmosferic este realizată de bacteria sporulată *Clostridium pasteurianum* descrisă de Winogradsky (1893). Ulterior, folosindu-se experimental N^{15}, capacitatea fixatoare de azot a fost evidenţiată şi la alte bacterii din genul *Clostridium: C. americanum, C. beijerinckii, C. tetanomorphum, C. butyricum.*

C. pasteurianum este un microorganism anaerob obligat, care se dezvoltă în condiţii optime la 20—30°C şi *p*H 8,9—7,5. Cultivat într-un mediu lipsit de azot dar care conţine hidrocarbonate, el obţine energia din fermentarea acestora (cu producere de acid butiric şi gaze) şi cu ajutorul ei fixează azotul molecular din atmosferă. Cantitatea de azot fixat este proporţională cu cantitatea de glucoză fermentată şi este de aproximativ 3 mg azot/gram de glucoză consumată, însă randamentul fixării este superior atunci cînd concentraţia în glucide a mediului nu este prea mare. Este demonstrat că singurul factor care limitează într-o oarecare măsură importanţa acestui fixator de N_2 în natură sînt cerinţele lui specifice de substanţe carbonate organice (hidraţi de carbon solubili, glicerină, manită etc.), care nu se găsesc în sol în concentraţii mari.

Aceşti compuşi se formează în sol în special prin descompunerea resturilor vegetale şi animale, fapt care explică observaţia că randamentul fixării N_2 de către *Cl. pasteurianum* este maxim atunci cînd această bacterie este asociată cu bacterii celulozolitice anaerobe.

Fixarea anaerobă a azotului molecular are un rol esenţial în solurile puţin aerate sau invadate de apă, în cîmpuri de orez, mlaştini, pe fundul bazinelor cu apă etc., unde *Cl. pasteurianum* este singurul fixator de N_2. Fedorov insistă asupra importanţei acestui proces în natură, arătînd că din solurile în care s-a fixat N_2, *Azotobacter* a fost izolat numai în 30% din cazuri, în celelalte (70%) fixarea N_2 fiind realizată cu cea mai mare probabilitate de *Cl. pasteurianum* şi de alte organisme.

Alte microorganisme libere fixatoare de N_2. Capacitatea de fixare a azotului molecular a fost evidenţiată şi la alte categorii de microorganisme libere. Unele bacterii sulfuroase fotosintetizante, ca *Rhodopseudomonas capsulata, R. gelatinosa, R. palustris, Rhodospirillum rubrum,* fixează N_2 cu un randament care poate ajunge la 14,2 mg N/g substanţă energetică utilizată. Fixează, de asemenea N_2, însă cu randament mai slab, bacterii din genurile *Desulfovibrio, Spirillum, Pseudomonas, Bacterium* (*B. herbicola, B. carotovorum*) ş. a.

Bacteriile oligonitrofile reprezintă o categorie aparte de fixatori de N_2, dezvoltarea lor fiind condiţionată de prezenţa în mediu a unor cantităţi extrem de mici de azot combinat (minimum 0,003 mg/l şi optimum 2,8 mg/l exprimat în NH_3) introduse în condiţii de laborator o dată cu impurităţile prezente în diferitele substanţe folosite la prepararea mediului. Aceste cantităţi infime de azot combinat sînt necesare numai pentru a iniţia creşterea bacteriană şi pentru a stimula activitatea fixatoare.

Microorganismele oligonitrofile aparţin speciilor *Bacillus asterosporus, Mycobacterium oligonitrophylum, Pseudomonas* sp., *Endosporus azotophagus* etc. Deşi randamentul lor de fixare este mic, ele au o mare importanţă pentru balanţa azotului în natură, datorită abundenţei şi răspîndirii lor largi, aproape în toate tipurile de sol.

Capacitatea fixatoare de azot molecular a mai fost observată şi la alte categorii de microorganisme, ca: actinomicete (*Proactinomyces* sp.), levuri (*Saccharomyces* sp. *Torula, Lypomyces* sp.), mucegaiuri (*Phoma radicis, P. betae*) şi la numeroase alge din genurile *Nostoc* (*N. paludosum, N. commune, N. muscorum*), *Anabaena* (*A. azotica, A. cylindrica, A. fertilissima*), *Anabaenopsis, Calothrix, Chlorogloca, Scytonema, Stigonema, Tolypothrix* ş. a.). Fixarea azotului de către alge se face foarte lent şi este influenţată de intensitatea luminii. În prezenţa unei surse de C organic, algele fixează N_2 şi la întuneric. Datorită exigenţelor lor nutritive mici, algele albastre sînt primele microorganisme care populează stîncile golaşe şi care, fixînd CO_2 şi N_2 din atmosferă, sintetizează substanţe organice care servesc ulterior ca substanţe nutritive altor microorganisme.

Importanţa practică a fixării azotului atmosferic de către microorganismele libere. Deşi randamentul fixării azotului în condiţii naturale este greu de apreciat, Knowles (1965), folosind măsurători cu N^{15}, apreciază rata fixării în unele soluri din Quebec la 0,1—73 kg/ha/an, în condiţii anaerobe şi la

34,6 kg/ha/an în aerobioză. Cu toate acestea, spre deosebire de eficiența indiscutabilă a activității fixatoare de N_2 a microorganismelor simbiotice, valoarea contribuției pe care microorganismele libere o aduc la îmbogățirea cu azot a solului, deci fertilizarea lui, este încă destul de controversată, unii cercetători contestînd-o în mod absolut, în timp ce alții îi acordă o semnificație deosebită.

Această situație se datorește faptului că randamentul ridicat realizat de unele microorganisme libere fixatoare de N_2 (de exemplu, pentru *A. chroococcum*. 20 mg N/g substrat energetic consumat) este condiționat de coexistența tuturor condițiilor favorabile de mediu (sursă organică de energie și C, *p*H, umiditate, temperatură, microelemente etc.), condiții care în natură sînt rareori întrunite la valorile lor optime. În același timp, se știe că, de obicei, cantitățile de N_2 asimilabil din sol sînt relativ mici, unele soluri cultivate vreme îndelungată fiind chiar deficitare sub acest aspect, deoarece, cu fiecare recoltă se pierd din sol cantități importante de N_2. Cu toate acestea, solul nu este de fapt complet epuizat în N_2 asimilabil, în cea mai mare parte datorită microorganismelor fixatoare de azot molecular. Aceasta se explică prin faptul că, în condițiile naturale, îmbogățirea solului în N_2 nu este rezultatul activității unui singur grup de microorganisme, ci este o consecință a acțiunii *sinergice* a tuturor microorganismelor fixatoare libere. În plus, condițiile fizico-chimice și ecologice din acest mediu natural (substanțe nutritive, surse de energie, temperatură, *p*H, interrelații cu alte microorganisme) fac ca activitatea biologică a microorganismelor fixatoare de N_2 să se desfășoare într-un ritm și în limite cu totul diferite de condițiile de laborator.

Biochimia fixării N_2 de către microorganismele libere. Microorganismele fixatoare de azot au proprietatea de a folosi N_2 molecular atmosferic, pornind de la care își sintetizează constituenții celulari proteici după schema generală:

$$N_2 \rightarrow \begin{matrix}\text{produs metabolic}\\ \text{intermediar „cheie"}\end{matrix} \rightarrow \begin{matrix}\text{componente}\\ \text{metabolice}\\ \text{intermediare}\end{matrix} \rightarrow \text{proteină}$$

$$\xleftarrow{\text{anorganic}} \qquad \text{sfîrșit fixare} \qquad \xrightarrow{\text{organic}}$$

Cercetările efectuate cu extracte acelulare de *C. pasteurianum* în atmosferă de N_2^{15} au arătat că, după o scurtă expunere, aproape tot azotul fixat se găsește sub formă de $N^{15}H_3$, care ar reprezenta produsul metabolic intermediar „cheie", adică ultima substanță azotată anorganică (produs final al fixării) și reactantul inițial al asimilării, pornind de la care N_2 trece în combinații organice. Problema formleor intermediare sub care este fixat azotul pe calea $N_2 \rightarrow NH_3$ este foarte controversată, atît în ceea ce privește natura cît și existența lor. După ce N_2 este redus la NH_3, metabolismul azotului la microorganismele fixatoare de N_2 este același ca și la alte viețuitoare: se produce aminarea reducătoare a unui acid α-cetoglutaric în acid glutamic. În mod similar prin reacții de transaminare se formează acidul aspartic (în prezența oxalacetatului), alanina (în prezența piruvatului) și alți aminoacizi, care intră în rezervorul metabolic general al acizilor aminați:

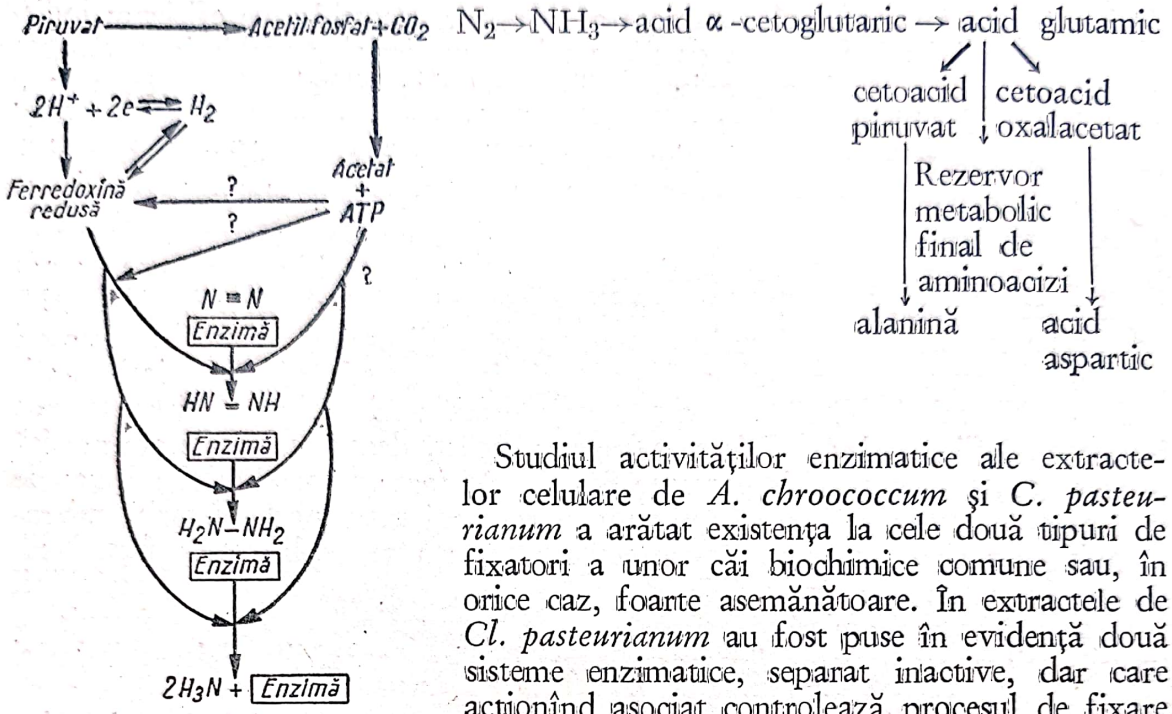


Fig. 419. Reprezentare schematică a secvenţei reacţiilor metabolice în cursul procesului de fixare biologică a azotului molecular (după Burris).

Studiul activităţilor enzimatice ale extractelor celulare de *A. chroococcum* şi *C. pasteurianum* a arătat existenţa la cele două tipuri de fixatori a unor căi biochimice comune sau, în orice caz, foarte asemănătoare. În extractele de *Cl. pasteurianum* au fost puse în evidenţă două sisteme enzimatice, separat inactive, dar care acţionînd asociat controlează procesul de fixare a N_2: *a*) *sistemul enzimatic care activează* N_2 (SAA), reprezentat probabil de o enzimă multifuncţională, compusă din două hidrogenaze — nitrogenaza — care este inductibilă şi, ca atare, apare numai în medii cu N_2; *b*) *sistemul donator de H* (SDH), reprezentat de totalitatea enzimelor care catalizează degradarea fosforoclastică a piruvatului. Într-adevăr, fixarea N_2 are loc cu consum de energie furnizată de ATP şi, ca atare, poate fi efectuată numai dacă în mediu se găseşte piruvat, compus care serveşte atît ca sursă de energie, cît şi ca donator de electroni pentru reducerea N_2. S-a mai demonstrat că la *Cl. pasteurianum* activarea N_2 se face cuplat cu reducerea la NH_3 a N_2 activat. Transportul de electroni de la substanţele reducătoare la N_2 este efectuat de ferredoxină (proteidă cu Fe neheminic), avînd rolul de transportor specializat, sau de unele substanţe care o pot înlocui ca rubredoxina şi flavodoxina.

b. Fixarea simbiotică a azotului molecular

În solurile cultivate cu leguminoase, rolul esenţial în fixarea biologică a N_2 atmosferic revine microorganismelor simbiotice care trăiesc în nodozităţile de pe rădăcinile acestor plante.

Formarea de nodozităţi pe rădăcinile leguminoaselor este cunoscută din antichitate, însă, pînă la descrierea lor şi a corpusculilor microscopici pe care-i conţin, făcută de M. S. Voronin în 1865, aceste formaţiuni au fost considerate a fi sau de natură tumorală sau provocate de înţepăturile unor insecte. În 1888, Hellriegel şi Wilfahrt au demonstrat prezenţa nodozităţilor radiculare, corelată cu capacitatea fixatoare de N_2, la plantele cultivate în sol

Fig. 420. Rădăcini de leguminoase cu nodozități (după Borton).

nesteril și absența nodozităților însoțită de incapacitatea fixării de azot în culturile vegetale, efectuate în sol steril. În același an, Beijerinck a izolat din nodozități microorganismul pe care l-a denumit *Bacillus radicicola* (astăzi genul *Rhizobium*), și a demonstrat rolul acestuia în procesul de fixare simbiotică a azotului.

Prezența nodozităților nu este comună tuturor speciilor de leguminoase (12—14 000), dar este întîlnită în toate climatele. Absența lor nu are semnificația unei inaptitudini esențiale a plantei-gazdă de a forma nodozități, ci este datorată de cele mai multe ori lipsei fortuite a tulpinii active de *Rhizobium*, specifică pentru planta respectivă, incapacității bacteriei active de a se adapta la anumite condiții ecologice particulare pentru a intra în simbioză cu planta sau acțiunii defavorabile a acestor condiții asupra biologiei plantei sub raportul răspunsului ei la infecția cu bacteria fixatoare.

Instalarea simbiozei, specificitatea infecției și eficiența fixării N_2 depind deci în mare măsură de anumite proprietăți ale plantei-gazdă și ale bacteriei și sînt influențate de condițiile de mediu (*p*H, t°, microelemente etc.).

Bacteriile care produc nodozități pe leguminoase aparțin genului *Rhizobium* (Fam. *Pseudomonadaceae*), care cuprinde mai multe specii, denumite după speciile de plante pe care le infectează cu predilecție: *R. leguminosarum* (pentru grupul mazăre), *R. phaseoli* (la fasole), *R. trifolii* (la trifoi), *R. lupini* (la lupin), *R. meliloti* (la lucernă), *R. japonicum* (la soia) [1].

[1] Întrucît aceeași specie de *Rhizobium* poate infecta mai multe specii leguminoase s-a încercat clasificarea rhizobiilor în funcție de „grupul de inoculare încrucișată", care reunește toate speciile de plante capabile să găzduiască același tip de bacterie. Din cele 32 de grupuri descrise, 6 sînt mai stabile și de referință curentă, corespunzînd speciilor enumerate mai sus; grupurile *Pisum, Phaseolus, Trifolium, Lupinus, Melilotus Soya.* Deși folosită curent, definirea speciilor de *Rhizobium* conform acestui criteriu este convențională, datorită frecventelor corespondențe între grupuri și incompatibilităților foarte numeroase în interiorul aceluiași grup.

Fig. 421. Secţiune longitudinală printr-un păr radicular de *Trifolium parviflorum* infectat cu *Rhizobium*. Se observă începutul filamentului („cordonului") infecţios la extremitatea încurbată a părului absorbant (după Shalman).

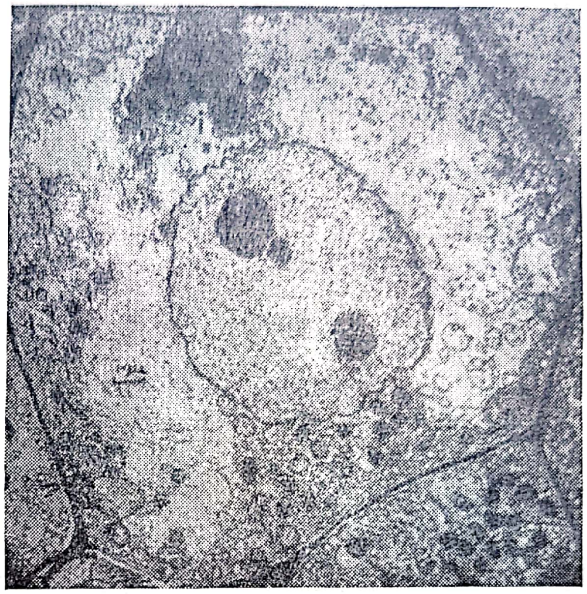


Fig. 422. Filament infecţios (*i*) de *R. meliloti* înaintînd într-o celulă radiculară de *Medicago sativa* L. (după Jordan).

Bacteriile din genul *Rhizobium* sînt microorganisme în formă de bacili Gram-negativi nesporulaţi, cu cili peritrichi şi înconjuraţi de o capsulă gomoasă formată din poliozide care dau coloniilor un aspect caracteristic. Pe medii de cultură artificiale, ele folosesc mono-, di- şi trizaharide, alcooli, acizi organici şi anumite polizaharide. Sînt bacterii aerobe. Ele folosesc N_2 doar atunci cînd trăiesc în asociaţie cu o plantă-gazdă şi de aceea pe medii artificiale au nevoie de N_2 combinat sub formă de glutamat sau de aminoacizi.

Infecţia şi dezvoltarea nodulului. Infecţia plantei-gazdă se produce la nivelul sistemului radicular, pe calea unui păr absorbant, a unor celule epidermice ori corticale lezate, sau a punctului de emergenţă a rădăcinilor laterale. Contaminarea este favorizată de faptul că secreţiile radiculare au un rol chimiotactic pozitiv faţă de bacterii. Părul absorbant se deformează ca un cîrlig, datorită modificării peretelui său care îşi pierde rigiditatea sub acţiunea acidului β-indolacetic provenit din acţiunea bacteriilor asupra triptofanului excretat de plante. Această acţiune, asociată cu aceea a poligalacturonazei, determină creşterea plasticităţii peretelui celular şi invaginarea lui activă, care permite infecţia părului absorbant (K e f f o r d, 1960). Bacteriile pătrunse în părul radicular formează un *filament infecţios*, aşa-numitul *cordon de infecţie*,

care înaintează spre baza părului prin invaginarea succesivă a pereţilor celulelor vegetale (similar invaginării parietale din cursul fagocitozei), ajungînd după 18—48 de ore în celulele parenchimului cortical. Pe toată întinderea lui, lanţurile de bacterii alcătuind *cordonul infecţios* sînt izolate de citoplasma celulei-gazdă, fiind înconjurate de o teacă formată dintr-un strat intern hemicelulozic de natură bacteriană şi un altul extern, celulozic, avînd continuitate cu peretele celulei vegetale gazdă (Bergersen şi Briggs). Înaintarea filamentului infecţios este asigurată de presiunea dezvoltată de bacteriile care cresc, inserate fiind în filament.

Formarea nodulilor şi structura lor. Cordonul de infecţie invadează celulele corticale prin invaginarea pereţilor acestora, ocolind nucleiii şi fără să producă reacţii evidente pînă cînd ajung în zona celulelor tetraploide din cortex. Aceste celule şi celulele diploide vecine încep să se dividă activ, formînd împreună un nodul cu formă caracteristică, în funcţie de specia planteigazdă (Rotschild, 1963). Structura nodulului este însă totdeauna aceeaşi, indiferent de specia partenerilor simbionţi: la periferia lui se află un înveliş extern — *cortexul nodulului* — provenit din celulele diploide şi cuprinzînd şi rudimentele unui sistem vascular. În interiorul nodulului, distal în raport cu baza părului absorbant, se diferenţiază o *zonă meristematică abacteriană* formată din celule di- şi tetraploide, care asigură creşterea nodulului şi o *zonă centrală* (zona *bacteriană*) de culoare roză pe secţiune, alcătuită din celule tetraploide invadate de *Rhizobium*, care conţine leghemoglobină *(leg Hb)* şi este sediul activităţii fixatoare de N_2. Zona bacteriană este mai mare la nodulii eficienţi sub raportul fixării N_2 şi reprezintă în genere 16—50% din greutatea uscată a nodozităţilor. Situată proximal faţă de baza părului radicular, se găseşte *zona bazală* de culoare verde, foarte bogată în vase liberiene, care conţine bacteroizi dezintegraţi şi are rolul de a aproviziona nodozitatea cu substanţe nutritive provenite din corpul plantei.

Liberarea bacteriilor în zona centrală a nodulului este precedată de formarea pe cordonul infecţios a unei *vezicule*, care, la rîndul ei, emite o pre-

Fig. 423. Secţiune printr-o nodozitate radiculară de soia infectată cu *R. japonicum*, evidenţiind porţiunea umflată a unui filament infecţios, lipsită de celuloză şi o bacterie (*BI*) migrînd în citoplasmă prin endocitoză; *BN* = nucleul bacterian (după Goodchild).

lungire — delimitată de o membrană necelulozică — în care migrează o bacterie. În etapa următoare, această bacterie trece într-o celulă a gazdei, printr-un proces de *endocitoză*, şi rămîne acolo închisă într-o *vacuolă de infecţie* delimitată de o membrană provenită din celula-gazdă. Bacteriile intracelulare se multiplică în aceste vacuole, care la fiecare diviziune bacteriană se divid şi ele în mai multe vacuole-fiice, pe cînd celula-gazdă ajunge să fie plină cu bacterii incluse în vacuole individuale. Într-o fază ulterioară, diviziunea bacteriilor nu mai este urmată de diviziunea vacuolei, astfel că atunci cînd celulele zonei centrale a nodulului au ajuns la maturitate, fiecare dintre vacuolele lor conţine nu una, ci 4—6 bacterii. În nodulii imaturi, *Rhizobium* se găseşte sub formă de bastonaşe, capabile de a se divide activ. Cînd nodulii au ajuns la maturitate, încep să apară în ei bacteroizi, rhizobii cu morfologia alterată, datorită slăbirii rigidităţii peretelui celular, care se prezintă în forme ramificate (de *x* sau *y*) cu umflături la una sau ambele extremităţi şi sînt incapabile de diviziune, dar păstrează încă o oarecare capacitate de sinteză.

În ultima fază a evoluţiei infecţiei se observă *dezintegrarea nodozităţii*. Cu excepţia nodozităţilor unor plante vivace perene, din regiunile tropicale, care persistă timp de 5—6 ani, nodulii de pe rădăcinile majorităţii leguminoaselor sînt structuri *efemere*, care degenerează după fiecare ciclu sezonier (la plantele anuale, ei durează circa 2—3 luni, pînă la epoca înfloririi). Degenerescenţa bacteroizilor şi, concomitent, a celulelor vegetale infectate sînt datorate probabil încetării aportului glucidic din planta-gazdă şi sînt precedate de alterări morfologice progresive, care duc la dezintegrarea întregii zone centrale a nodozităţii. Cortexul nodular, mai rezistent, poate persista un timp mai îndelungat, rămînînd ca un sac gol, ataşat de rădăcină.

Activitatea fixatoare de N_2 a diferitelor specii de *Rhizobium* este variabilă de la o tulpină la alta, în funcţie de două proprietăţi importante: *infecţiozitatea*, deci capacitatea de a pătrunde în rădăcinile plantei, de a se multiplica acolo şi de a forma nodozităţi la suprafaţa lor, şi *eficienţa*, adică aptitudinea de a fixa intens N_2. În funcţie de această ultimă proprietate există tulpini bacteriene *active* sau *inactive*, astfel încît simpla prezenţă a nodozităţilor nu reprezintă în sine o garanţie că planta beneficiază într-adevăr de o fixare bacteriană activă a N_2.

Cele două proprietăţi ale rhizobiilor nu sînt corelate, ci, dimpotrivă, tocmai tulpinile ineficiente sînt cele mai virulente, în sensul că induc formarea unui număr mai mare de nodozităţi, la nivelul cărora însă relaţia bacterie-plantă nu mai este de tip simbiotic, ci devine chiar dezavantajoasă pentru gazdă. În raport cu activitatea de fixare a azotului s-au descris două tipuri de nodozităţi: *eficiente* şi *ineficiente*.

Nodozităţile eficiente, relativ puţin numeroase, se găsesc în special pe rădăcinile principale, sînt mai voluminoase şi au o suprafaţă netedă sau rugoasă. La examenul microscopic al nodulului se observă o infecţie generalizată a ţesutului periciclic, iar în centru o „zonă bacteriană" foarte bine dezvoltată. Activitatea lor fixatoare este prelungită (cel puţin o lună) şi de

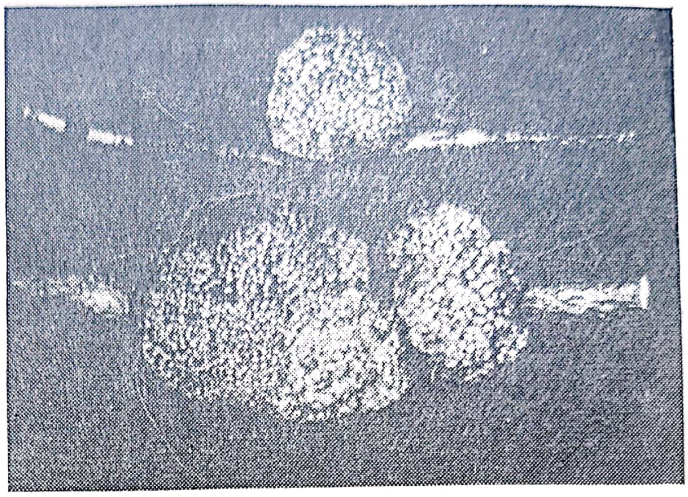


Fig. 424. Grămezi de nodozităţi radiculare dezvoltate pe rădăcini de *Alnus glutinosa* (după Bond).

4—6 ori mai intensă decît aceea a nodozităţilor „ineficiente". Din punct de vedere chimic, în zona centrală, plină de bacteroizi, unde are loc fixarea N_2, se găseşte un pigment roşu de natură hemoproteică, denumit *leghemoglobina* („hemoglobina" leguminoaselor), care este singurul reprezentant al hemoglobinelor în regnul vegetal. Leghemoglobina apare în stadiul activ al fixării N_2, corespunzător perioadei de transformare a bacteriilor în bacteroizi, şi numai în nodulii eficienţi ajunşi la maturitate, ca rezultat al simbiozei bacteriei cu planta-gazdă, asociaţie în care la sinteza acestui pigment bacteriile ar contribui cu nucleul hem, iar planta cu proteina. Prezenţa leghemoglobinei, care nu poate fi sintetizată nici de bacterii şi nici de plantă, trăind separat, este în strînsă relaţie cu fixarea N_2, a cărei intensitate, la rîndul ei, este proporţională cu concentraţia acestui pigment în nodozităţi (V i r t a n e n). În nodozităţile active s-au mai evidenţiat derivaţi ai leghemoglobinei, ca *legmethemoglobina* sau *leghemiglobina* (brună) şi *legcholeglobina* (verde), care se formează din leghemoglobină în perioada de degenerare a nodozităţii şi determină oprirea procesului de fixare şi modificarea de culoare a nodozităţii.

Nodozităţile ineficiente, mai numeroase şi mai mici, au suprafaţa netedă şi sînt răspîndite pe tot sistemul radicular. Infecţia din interiorul lor este mult mai limitată, iar numărul bacteriilor şi mai ales al bacteroizilor este mult mai mic. Ele nu conţin leghemoglobină.

Fixarea simbiotică a N_2 de către bacteriile plantelor neleguminoase. În afară de leguminoase, numeroase alte plante pot intra în relaţii de simbioză cu microorganisme fixatoare de N_2, devenind astfel purtătoare de nodozităţi radiculare. Printre *Angiospermae*, fenomenul a fost pus în evidenţă la peste 200 de specii aparţinînd familiilor *Betulaceae*, *Casuarinaceae*, *Coriariaceae*, *Ericaceae*, *Myricaceae*, *Rhamnaceae* şi *Rosaceae*, care trăiesc în special în soluri deficitare în N_2 (genul *Alnus*, de exemplu, de-a lungul cursurilor de apă) (S t e w a r t, 1967).

Microorganismele simbiotice — probabil actinomicete din genul *Streptomyces* — care infectează planta pe calea unui păr absorbant, au un tropism

marcat pentru nucleul celulelor-gazdă, determinînd hipertrofia lui în urma infecţiei. Nodozităţile apar lateral pe rădăcini, sub forma unor mase coraloide polilobate, perene, cu Ø 10—15 cm.

Capacitatea de a forma nodozităţi şi de a fixa N_2 în simbioză cu microorganismele este întîlnit şi la 6 genuri de *Gymnospermae*. Dintre acestea, mai bine studiate sînt *Podocarpus*, al cărui simbiont este un phycomycet intracelular localizat în cortexul nodulului, şi cicadeele nodulate din genurile *Macrozamia* şi *Encephalartos*, al căror partener microbian este o algă albastră din genurile *Nostoc* sau *Anabaena*, localizată într-un spaţiu aerian distinct din cortexul nodular.

Biochimismul şi fiziologia procesului de fixare la aceste plante pare să fie similar aceluia de la leguminoase, iar randamentul lui este foarte ridicat: de exemplu, în cazul speciilor *Alnus rugosa, A. glutinosa, A. rubra*, creşterea conţinutului solului în azot total poate să ajungă pînă la 150—180 kg/ha/an (Allen şi Allen, 1964). În sfîrşit, unele plante tropicale din genurile *Ardisia, Pavetta, Psychotria* ş. a. formează în frunze formaţiuni similare nodozităţilor, constînd din cavităţi subepidermice umplute cu un mucilagiu în care se găseşte bacteria fixatoare de N_2, *Klebsiella rubiacearum*.

Biochimismul fixării azotului de către microorganismele simbiotice. Procesul biochimic de fixare simbiotică a azotului molecular se desfăşoară, ca şi acela al fixării realizate de microorganismele libere, în trei etape succesive: *1) activarea* N_2 gazos; *2) combinarea* N_2 activat cu H şi trecerea lui în formă redusă; *3) încorporarea* N_2 redus în molecule organice. În nici una din aceste etape nu s-a putut stabili fără echivoc succesiunea reacţiilor enzimatice şi a transferurilor de electroni. Datorită acestui fapt, în prezent nu există o concepţie unitară în explicarea procesului biochimic de fixare, iar modelele care au fost propuse de unii cercetători, în special pe baza experimentării cu izotopul N^{15}, sînt contestate de alţi autori în ceea ce priveşte diferite aspecte, mai mult sau mai puţin importante.

Prima etapă a fixării N_2 ar fi realizată cu ajutorul unei enzime sau al unui sistem de enzime denumit „nitrogenază", de natură şi cu un mod de acţiune necunoscute. Această etapă ar fi cuplată cu aceea de reducere a N_2 activat, efectuată de un sistem enzimatic diferit, din activitatea căruia rezultă NH_3 ca prim produs liber stabil, format probabil direct fără trecerea prin produşi intermediari. Cuplarea celor două reacţii enzimatice explică formarea fără latenţă a $N^{15}H_3$ în noduli, chiar din primul minut de expunere la N^{15}. În ultima etapă, NH_3 este transformat rapid în compuşi α-aminaţi, intrînd astfel în rezervorul de aminoacizi al celulelor din nodozităţi. Primul compus azotat organic care apare este, după Allison şi Burris, *acidul glutamic*, care este format prin combinarea a NH_3 cu acidul cetoglutaric, rezultat din fermentarea de către bacteroizi a unora dintre produşii de fotosinteză. Ulterior, sub acţiunea glutaminsintetazei şi a transaminazelor sintetizate de bacteroizi s-ar face trecerea de la acidul glutamic la *glutamină* şi la toată seria de aminoacizi obişnuiţi. În acest proces, substanţele carbonate rezultate din fotosinteză

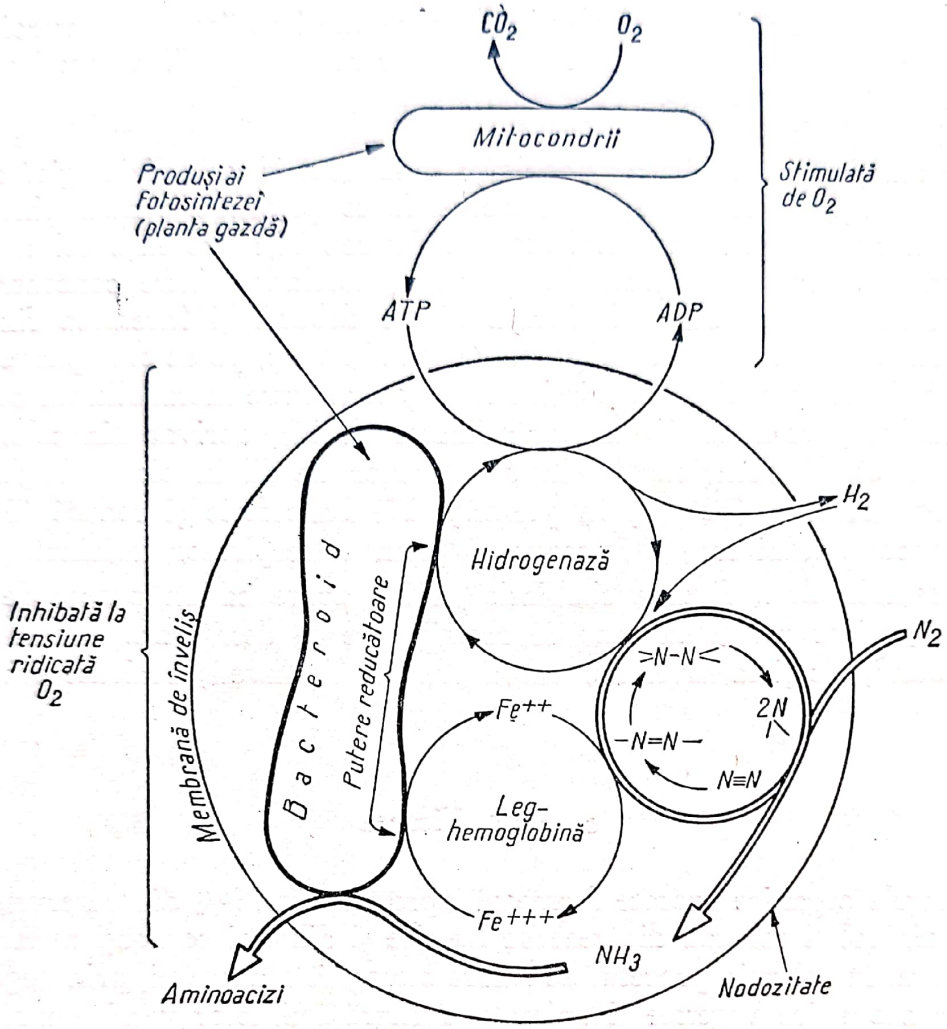


Fig. 425. Reprezentare diagramatică a mecanismului biochimic de fixare a azotului de către bacteriile din nodozităţi (după Bergersen).

sînt folosite de bacteroizi ca sursă de C şi de energie, iar după oxidarea lor parţială servesc ca donatori de H pentru reducerea N_2 activat.

Fixarea N_2 are loc în zona centrală a nodozităţii în care se găsesc bacteroizii, unde se sintetizează leghemoglobina; după cum a arătat B e r g e r s e n, există o corelaţie strînsă între volumul acestui ţesut central şi cantitatea de N_2 fixat. Sediul celular al fixării în nodul este încă necunoscut (B u r r i s, 1966). Experimentînd cu nodozităţi de soia, B e r g e r s e n propune un model în care unitatea funcţională de fixare este reprezentată de bacteroidul închis în membrana sa dublă de înveliş. Eficienţa acestei unităţi funcţionale ar fi condiţionată, pe de o parte, de aprovizionarea ei cu ATP (sistemul generator de energie rezultat din activitatea numeroaselor mitocondrii de la periferia celulelor gazdă), iar pe de altă parte, de capacitatea bacteroidului de a reduce *legHb* ($Fe^{+++} \longrightarrow Fe^{++}$). După acest autor, fixarea N_2 s-ar face la nivelul

membranelor de origine plasmalemică în care este îmbrăcat un bacteroid izolat sau un grup de bacteroizi, la nivelul acestor membrane fiind localizate enzimele capabile să lege N_2. Kennedy (1965) atribuie însă acest rol bacteroidului însuşi, iar Klucas (1964) a găsit cea mai mare cantitate de N^{15} fixat în fracţiunea solubilă a nodozităţii. Nici semnificaţia fiziologică a *legHb* nu este bine clarificată, deşi numeroase fapte pledează pentru participarea efectivă a acestui pigment respirator în fixarea N_2: prezenţa lui alături de bacteroizi exclusiv în nodozităţile eficiente, corelaţia dintre concentraţia lui şi intensitatea fixării N_2, coincidenţa dintre debutul şi încetarea fixării, pe de o parte, şi apariţia şi dispariţia pigmentului hemic, pe de altă parte. *LegHb* ar constitui deci o verigă biochimică de legătură între metabolismul celular al bacteroidului şi complexul enzimatic fixator de N_2, derivat din celula-gazdă prin aceea că ea funcţionează ca un donator de H în ciclul de fixare, şi anume este oxidată (Fe^{+++}) în prezenţa N_2 atmosferic şi redusă (Fe^{++}) la nivelul bacteroidului care o foloseşte ca pigment respirator terminal.

În ansamblu deci, fixarea simbiotică a N_2 apare ca un proces de oxido-reducere realizat printr-un lanţ de reacţii care se desfăşoară atît la nivelul bacteroidului, cît şi la nivelul membranelor lui de înveliş derivate din celula-gazdă.

c. Amonificarea

Substanţele organice azotate formează aproximativ 99% din rezervele totale de azot din sol şi constau din rezerve humice şi din alţi compuşi acumulaţi în mod natural în sol prin procesul de fixare biologică a azotului, prin degradarea resturilor oroganice vegetale şi animale, a îngrăşămintelor verzi, gunoiului de grajd etc. Numai microflora şi microfauna formează o masă de substanţă organică de natură predominant-proteică, reprezentînd cîteva tone/ha de sol. Dacă acest azot organic ar rămîne ca atare, rezervele de azot accesibile plantelor s-ar micşora în fiecare an, ajungînd la cantităţi care nu ar mai permite creşterea acestora. În mod normal însă, aceste substanţe suferă un proces de mineralizare, la sfîrşitul căruia o bună parte a azotului din constituţia lor este eliberat sub forma de NH_3. Procesul de amonificare, considerînd această noţiune în sensul ei larg, se desfăşoară în două etape:

1) *Etapa nespecifică,* datorită activităţii metabolice a microorganismelor heterotrofe banale şi constînd din degradarea macromoleculelor proteice la compuşi mai simpli *(peptone, peptide, aminoacizi, uree)* sub acţiunea proteazelor microbiene extracelulare.

2) *Etapa specifică,* legată de activitatea biologică a unor microorganisme din microflora constantă a solului, care utilizează produşii amintiţi rezultaţi din etapa precedentă, supunîndu-i unui proces de dezaminare, cu eliberare de NH_3.

În sens strict, amonificarea poate fi deci definită ca un *proces biologic în care se liberează în sol NH_3 ca rezultat al acţiunii microflorei solului asupra moleculelor aminate rezultate din descompunerea substanţelor proteice*. În acest sens restrîns, liberarea de NH_3 sub acţiunea proteolitică a microflorei temporare de putrefacţie nu este inclusă în sfera noţiunii de amonificare.

Substanţele supuse amonificării — privită în sens larg — pot fi proteinele şi compuşii intermediari rezultaţi din hidroliza lar, acizii nucleici, acizii uric şi hipuric, ureea, chitina şi zaharurile animate. Ele provin din degradarea diferitelor organisme vegetale sau animale moarte, din excreţii, din procesul de fixare biologică a N_2 şi din introducerea în sol a îngrăşămintelor organice (gunoi de grajd, cianamida de calciu). Amoniacul liberat în cursul acestui proces este în parte neutralizat sub formă de săruri de NH_4, utilizabile de către plante şi, în anumite condiţii, chiar de către o serie întreagă de microorganisme şi, în parte, degajat ca atare în atmosferă sau adsorbit temporar pe complexele argilo-humice. În acest din urmă caz, cea mai mare parte a NH_3 rămas liber în sol este transformat, în condiţii de aerobioză — prin oxidare — în nitraţi, forma utilizată preferenţial de plantele superioare şi de unele microorganisme.

În condiţii naturale, procesul de amonificare decurge foarte lent. Ritmul şi randamentul său, reflectate de cantitatea de azot amoniacal care rămîne în sol la sfîrşitul procesului, sînt influenţate de condiţiile de mediu. Amonificarea se desfăşoară la nivelul său optim în straturile superficiale ale solurilor bine structurate, aerate, cu o umiditate potrivită, la o temperatură de 30° (limitele fiind cuprinse între 2° şi 40°C) şi în condiţii de *p*H apropiat de neutru. În solurile acide, ritmul amonificării este foarte lent, însă randamentul ei este maxim datorită capacităţii ridicate a acestor soluri de a neutraliza şi de a „fixa" NH_3 rezultat din acest proces. Dimpotrivă, randamentul amonificării este scăzut în solurile foarte alcaline, unde NH_3 rămîne liber, astfel încît, acumulat sub această formă, se comportă ca un inhibitor al microflorei.

Activitatea biologică a microflorei amonificatoare, mai ales în ceea ce priveşte randamentul amonificării, este influenţată de echilibrul cantitativ dintre C şi N în sol (valoarea raportului C/N nu trebuie să fie mai mare de 15—20). Apariţia unui exces de substanţe carbonate în sol (datorită, de exemplu, încorporării de paie ca „îngrăşămînt verde", fără asocierea de substanţe minerale azotate) are un efect negativ asupra randamentului amonificării, care scade foarte mult: în prezenţa unei cantităţi mari de material energetic, microflora heterotrofă proliferează foarte intens, consumînd şi imobilizînd întreaga rezervă de substanţe minerale din sol (inclusiv NH_3 produs prin amonificare).

Amonificarea proteinelor. Într-o primă etapă, proteinele sînt atacate de o microfloră heterotrofă nespecifică şi transformate în polipeptide, peptone, acizi aminaţi. În continuare, asupra acestor produşi de proteoliză acţionează bacterii din speciile *B. mycoides, B. mesentericus, B. megaterium, B. subtilis, W. perfringens, Pseudomonas fluorescens, P. nonliquefaciens, Sarcina lutea.*

După 2—3 zile, cînd degajarea de NH_3 este maximă, intră în acţiune actinomicetele, apoi se produce o invazie de mucegaiuri, după care cantitatea de NH_3 liber scade datorită faptului că aceste din urmă microorganisme îl folosesc pentru sintezele lor proteice.

Amonificarea acizilor nucleici. În faza iniţială, nespecifică, acizii nucleici din sol sînt transformaţi în moleculele lor constitutive (baze purinice şi pirimidinice, riboză sau dezoxiriboză şi fosfat) sub acţiunea ribonucleazei şi a dezoxiribonucleazei elaborate în special de unii fungi (*Aspergillus* sp.). Ulterior, bazele purinice şi pirimidinice sînt degradate de microorganisme pînă la uree, care suferă apoi procesul normal de amonificare.

Amonificarea ureii. Ureea din sol provine din degradarea bazelor purinice şi pirimidinice, din metabolismul microbian şi din excreţii. Amonificarea ureii este efectuată de un grup de microorganisme specifice, *urobacteriile,* adaptate la concentraţii mari de NH_3 şi la *p*H alcalin, care elaborează urează. Procesul decurge după relaţia: $CO(NH_2)_2 + 2\,H_2O \rightarrow (NH_4)_2CO_3$

carbonat de amoniu
(foarte labil)

$$(NH_4)_2CO_3 \rightarrow 2\,NH_3 + CO_2 + H_2O.$$

Din grupul urobacteriilor fac parte speciile *B. probatus, Urobacillus pasteurii, U. miquelli, B. freudenreichii, Planosarcina ureae, Micrococcus ureae* ş. a. Activitatea amonificatoare a urobacteriilor este foarte importantă, deoarece ureea conţine 47% N, care altfel ar rămîne neutilizat de plante, iar cantitatea anuală de uree eliminată în natură este foarte mare, atingînd cîteva zeci de milioane de tone/an (se apreciază că populaţia umană a globului elimină în 24 de ore circa 15 mii tone N ureic, iar toate celelalte animale la un loc circa 1 500 mii tone). Procesul de amonificare reprezintă o etapă indispensabilă a circulaţiei N în natură. Prin el se realizează mineralizarea N organic şi trecerea lui în formă amoniacală, utilizabilă ca atare sau după oxidare la nitraţi, în nutriţia minerală azotată a plantelor.

d. Nitrificarea

Nitrificarea este un proces biologic de oxidare la nitraţi a NH_3 sau a altor forme reduse ale azotului — liberate în sol în cursul procesului de amonificare — oxidare realizată de microorganisme specifice, cu nutriţie autotrofă, de tip *chimiosintetizant. Nitraţii* reprezintă forma de compus azotat *cea mai uşor asimilabilă* pentru majoritatea plantelor verzi dar, în acelaşi timp, constituie şi forma sub care N din sol poate fi perdut prin levigaţie sau prin denitrificare. Natura biologică a procesului de nitrificare a fost demonstrată de suprimarea lui prin sterilizarea solului (Schloessing, 1877. Winogradski a demonstrat că acest proces se desfăşoară în două etape, sub acţiunea unor microorganisme specifice:

1) *Faza de nitritare,* constînd în oxidarea amoniacului la nitriţi sub acţiunea *nitritbacteriilor* din genurile *Nitrosomonas* (*N. europaea, N. monocella, N. oligocarbogenes*), *Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosogloea.*

2) *Faza de nitratare*, în care are loc oxidarea nitriţilor la **nitraţi** sub acţiunea nitratbacteriilor din genurile *Nitrobacter* (*N. winogradskii*, *N. agilis*) şi *Bactoderma* (*B. alba*, *B. rosea*).

Bacteriile nitrificatoare, strict aerobe şi cu o activitate optimă la *p*H 7,6—7,8 şi la temperatura de 28°C, sînt microorganisme *chemolitotrofe*. Unica lor sursă de energie este energia liberată de oxidarea compuşilor minerali ai N, pe care-i folosesc şi ca sursă de N pentru sintezele lor, iar sursa lor de C este reprezentată fie de CO_2 din atmosferă, fie de diferiţi carbonaţi sau bicarbonaţi de mediu.

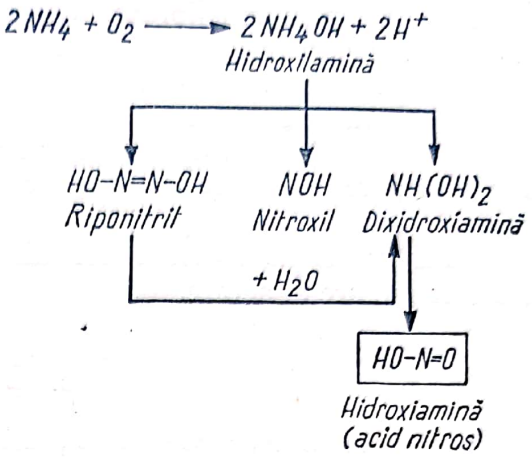


Fig. 426. Prima fază (nitratarea) a mecanismului biochimic al procesului de nitrificare (după Kluyver).

În culturi pure, bacteriile nitrificatoare nu pot utiliza substanţele organice, acestea exercitînd chiar asupra lor un efect bacteriostatic constînd din inhibiţia proceselor oxidative şi a creşterii celulare. În medii naturale, acest efect este atenuat de prezenţa microorganismelor heterotrofe, care prin procesele lor de nutriţie scad cantitatea de substanţă organică sub pragul bacteriostatic pentru nitrificatori, contribuind astfel la realizarea condiţiilor necesare activităţii de nitrificare.

Mecanismul biochimic al procesului de nitrificare este puţin cunoscut. Mai bine studiat este prima lui fază, aceea de nitritare, care după K l u y v e r ar decurge în trei etape după schema din figura 426.

Faza de nitratare ar evolua după reacţia globală: $NO_2^- + 1/2\ O_2 \rightarrow NO_3^- + \Delta F$ 16 000 calorii (17 kcal), şi s-ar realiza în trepte prin două transferuri ale unui electron (*e*), conform reacţiilor: $NO_2^- \rightarrow NO_2^- + e$; $NO_2^- + H_2O \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + e$; $2H^+ + 1/2\ O_2 + 2e \rightarrow H_2O$.

Deşi în condiţii de laborator nitriţii apar constant ca *produşi intermediari*, existenţa lor în sol nu a putut fi pusă în evidenţă, ceea ce a permis supoziţia că în natură ar exista microorganisme capabile să oxideze NH_3 direct la nitraţi. De fapt însă, cele două grupuri de microorganisme nitrificatoare (nitrit- şi nitratbacteriile) coexistă în strînsă asociere în sol, fapt care face ca nitriţii să fie folosiţi imediat de nitratbacterii, pe măsură ce sînt formaţi, chiar dacă ei sînt în cantităţi foarte mici. Această asociere funcţională exercită un rol protector pentru vieţuitoarele din sol, deoarece acumularea de nitriţi, care sînt toxici, le-ar fi dăunătoare. Cantitatea de nitraţi din sol, în general mică, reprezentînd 2—20 mg/kg, poate atinge 60 mg/kg sol în solurile fertile datorită acţiunii bacteriilor nitrificatoare, care este maximă primăvara şi vara. Cele mai mari concentraţii în nitraţi se întîlnesc în orizonturile superficiale ale solului, unde datorită prezenţei O_2, activitatea microorganismelor nitrificatoare este optimă. Ţinînd seama de acest fapt, procesul de nitrificare poate

fi favorizat prin ameliorarea aerării solului cu ajutorul procedeelor agrotehnice care asigură menţinerea unei structuri permeabile pentru aer.

Nitrificarea este un proces de o excepţională importanţă în natură, deoarece aduce substanţele azotate din sol în forma lor cea mai uşor asimilabilă de către plante. De altfel, s-a observat că în general numărul microorganismelor nitrificatoare este proporţional cu fertilitatea solului, el putînd ajunge în solurile foarte fertile pînă la 1 milion de bacterii/gram sol. Este sigur că numărul mare de nitrificatori din aceste soluri se datoreşte şi faptului că ele sînt lucrate şi aerate.

e. Denitrificarea

Nitraţii acumulaţi în sol, ca rezultat al procesului de nitrificare, sînt în mare parte consumaţi de plantele superioare, iar o cantitate variabilă din ei este spălată de apele de infiltrare şi şiroire. Nitraţii pot fi folosiţi şi de microorganisme, fie că sînt asimilaţi în cursul proceselor de sinteză a proteinelor celulare *(asimilarea nitraţilor)*, fie că sînt reduşi, prin procesul de denitrificare, cu ocazia oxidării unei substanţe organice sau minerale *(dezasimilarea nitraţilor)*. Denitrificarea este deci procesul de respiraţie, realizat pe calea unei reduceri dezasimilatorii, prin care unele specii bacteriene utilizează nitraţii, sau alţi compuşi oxigenaţi ai azotului mineral, ca acceptori finali de H. Reducerea nitraţilor în cursul denitrificării se face fie pînă la N_2 sau NH_3, fie pînă la stadii intermediare ca nitriţii, acidul hiponitros etc.

Microorganismele denitrificatoare pot fi împărţite, după K l u y v e r, în două grupe:

1) Bacteriile denitrificatoare *facultative*, de exemplu, *Aerobacter aerogenes*, care pot folosi în condiţii de anaerobioză diferite substraturi oxigenate între care şi NO_3^-.

2) Bacteriile denitrificatoare *obligate*, care nu se pot dezvolta în anaerobioză în lipsa unui compus oxigenat al azotului: NO_3^-, NO^*, N_2O, aşa cum sînt, de exemplu, *Micrococcus denitrificans*, *B. denitrificans*, *B. nitroxus*, *B. stutzeri*, *Vibrio denitrificans* etc.

Majoritatea acestor bacterii sînt microorganisme heterotrofe, care folosesc ca sursă de energie produşii degradării biologice a celulozei efectuată de microorganismele anaerobe celulozolitice cu care trăiesc în asociaţie. Unele bacterii autotrofe folosesc şi ele nitraţii ca donatori de O_2 pentru oxidarea unei substanţe minerale. De exemplu, *Thiobacillus denitrificans* oxidează S şi H_2S în condiţii de anaerobioză, utilizînd O_2 din NO_3^-; *Hydrogenomonas* reduce nitraţii pentru a oxida H_2 etc. La toate speciile cunoscute, folosirea O_2 din NO_3 nu constituie o reacţie strict obligatorie, deoarece poate fi înlocuită cu alte mecanisme de oxido-reducere. Chiar bacteriile obligat denitrificatoare au nevoie de compuşii oxigenaţi ai azotului numai în anaerobioză.

Procesul de denitrificare este favorizat în condiţii de anaerobioză de prezenţa substanţelor organice, în special a celor solubile şi uşor oxidabile, de prezenţa secreţiilor radiculare din rizosferă şi de umiditatea ridicată, caracteristică solurilor anaerobe insuficient drenate. În solurile acide, la *p*H 5,5,

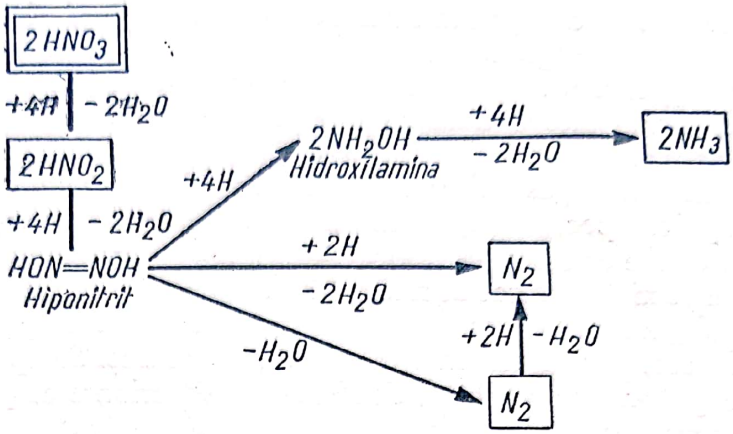


Fig. 427. Căile biochimice ale reducerii nitraţilor (după Verhoeven, Kluyver şi Van Niel). Produşii denitrificării sînt încadraţi în chenar simplu.

denitrificarea este inhibată datorită unei influenţe negative directe a acidităţii asupra activităţii enzimelor implicate în acest proces, iar la *p*H 6,0—6,5 reducerea se opreşte în cea mai mare parte la oxid nitros (N_2O), care se acumulează în cantitate mare, în timp ce la *p*H mai ridicat nitraţii sînt reduşi pînă la N_2. Denitrificarea se face lent la temperaturile extreme de 2°C şi 60°C (microorganismele termofile) şi cu o intensitate maximă la 25—30°C. Reducerea nitraţilor pînă la N_2 gazos reprezintă un *proces negativ* pentru fertilitatea solului, prin pierderea substanţială de azot care poate ajunge la 120 kg N_2/ha/an, ceea ce constituie o cauză a micşorării coeficientului de utilizare a substanţelor azotate de către plante, cu toate că o parte din N_2 degajat poate fi preluat de fixatorii anaerobi *(Cl. pasteurianum)*. O reducere incompletă a nitraţilor numai pînă la stadiile intermediare de nitriţi şi NH_3, este mai puţin dăunătoare, deoarece NH_3 poate fi folosit de unele microorganisme heterotrofe, în timp ce nitriţii sînt preluaţi de nitratbacterii şi reoxidaţi în nitraţi.

Denitrificarea este inhibată de prezenţa O_2 care ar diminua sinteza şi activitatea nitrat-, nitrit- şi oxidnitros-reductazelor (Pichinoty), 1965). Pentru conservarea fertilităţii solurilor, procesul de denitrificare poate fi împiedicat sau diminuat prin măsuri agrotehnice capabile să înlăture condiţiile de mediu care-i sînt favorabile; se recomandă în acest sens afînarea solului prin arat, pentru ameliorarea aerării, drenarea solurilor umede, dozarea judicioasă a îngrăşămintelor azotate etc.

3. PROCESE MICROBIENE DIN SOL IMPLICATE ÎN CIRCUITUL CARBONULUI ÎN NATURĂ

a. Descompunerea celulozei de către microorganisme

Celuloza, constituent al peretelui celulei vegetative, este un polizaharid $(C_6H_{10}O_5)_n$, din a cărui hidroliză rezultă molecule de celobioză, dizaharid alcătuit din două molecule de glucoză legate după tipul 1 : 4 β-*D* — glucopiranoză. Cantitatea de C aflat în natură sub formă de celuloză este foarte mare, de circa 350 miliarde tone în compoziţia organismelor vegetale vii (aproximativ

45—80% din greutatea uscată a plantelor) şi circa 700 miliarde tone în sol şi în turbă. Degradarea microbiană a celulozei în sol este un proces de o importanţă excepţională, fără de care cantităţi imense de carbon ajunse în acest mediu, mai ales o dată cu resturile vegetale, ar rămîne imobilizate într-o formă inaccesibilă pentru nutriţia carbonată a plantelor. În ţesuturile vegetale, celuloza nu se găseşte ca atare, liberă, ci este legată cu alţi constituenţi, cum sînt lignina, pectinele şi hemiceluloza, cu care formează complexe greu hidrolizabile. De cele mai multe ori, celulozoliza este precedată şi favorizată de procesele de pectinoliză, tot de natură microbiană, în urma cărora legăturile dintre fibrele de celuloză se desfac, astfel încît acestea ajung să fie expuse pe toată suprafaţa lor la acţiunea microflorei celulozolitice. Se apreciază că prin acţiunea microorganismelor celulozolitice plantele superioare ar primi anual pentru nutriţia lor carbonată aproximativ 15 tone CO_2. Degradarea biologică a celulozei a fost evidenţiată pentru prima dată de Omelianski, care a studiat evoluţia acestui proces în condiţiile de anaerobioză. Ulterior, Winogradsky a stabilit marea importanţă în natură a celulozolizei aerobe.

Degradarea aerobă este realizată de bacterii, de actinomicete şi de fungi. Bacteriile celulozolitice aerobe fac parte din genurile *Cellvibrio, Cellfalcicula, Cellulomonas, Cytophaga* şi *Sporocytophaga*. Genul *Cellvibrio*, cu speciile *C. ochracea* (pigment galben-ocre), *C. viridis* (verde), *C. fusca* (galben-brun) etc., cuprinde microorganisme în formă de virgulă, Gram-negative, aerobe, facultativ anaerobe, celulozolitice obligate (deoarece nu pot folosi altă sursă de C decît celuloza). Genul *Cellfalcicula* este reprezentat prin speciile *C. viridis, C. mucosa* şi *C. fusca*, ai căror membri sînt bacterii fuziforme, de asemenea celulozolitice obligate, dar cu acţiune lentă şi randament slab în scindarea celulozei. Genul *Cellulomonas*, cu specia *C. cellasca*, include bacterii facultativ celulozolitice cu acţiune de degradare lentă. În genul *Cytophaga*, din grupul myxobacteriilor sînt încadrate speciile *C. aurantiaca, C. rubra, C. tenuissima* (pigment verde), ale căror celule de formă alungită au aspectul unui filament incurbat în „S", „U" sau „V". În sfîrşit, bacteriile din genul *Sporocytophaga* — speciile *S. ellipsospora* şi *S. myxococcoides* — sînt caracterizate prin pre-

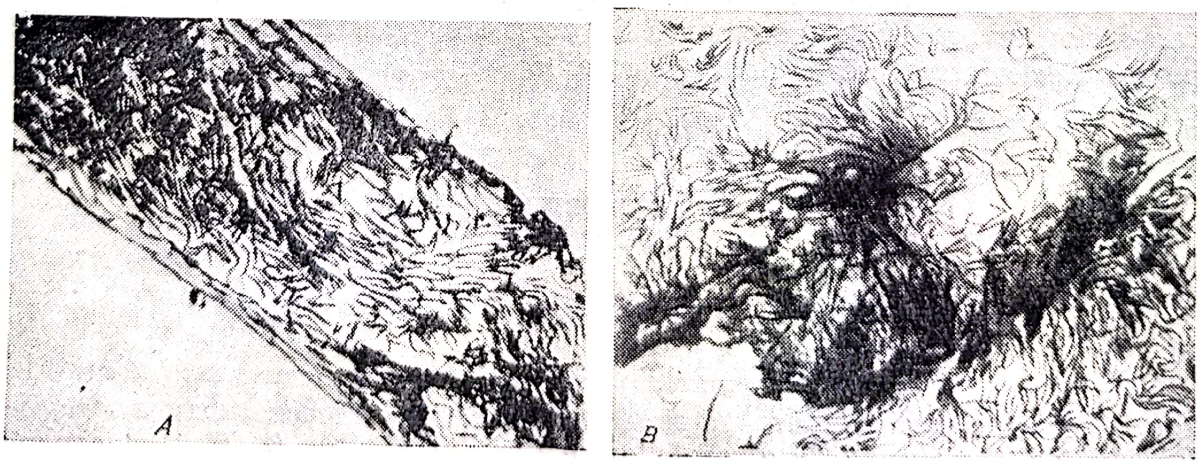


Fig. 428. Dezvoltarea bacteriei *Cytophaga hutchinsonii* pe o fibră de celuloză: faza iniţială (*A*) şi faza avansată de degradare a fibrei (*B*) (după Winogradski).

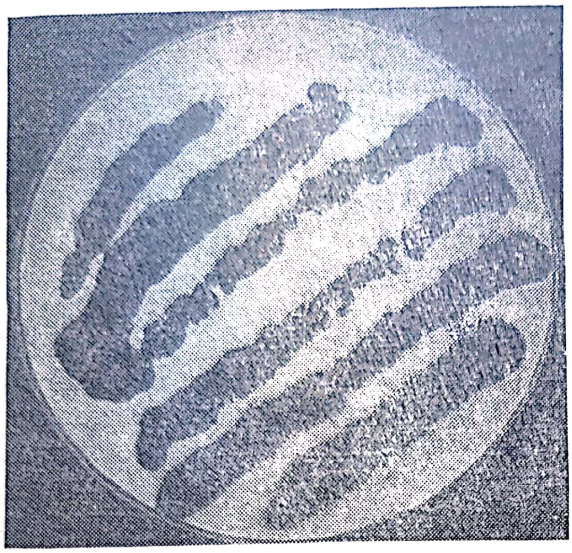


Fig. 429. Degradarea unei rondele de hîrtie de filtru însămînţată în striuri cu o cultură de bacterii celulozolitice (*Cytophaga* sp.) (după Winogradski).

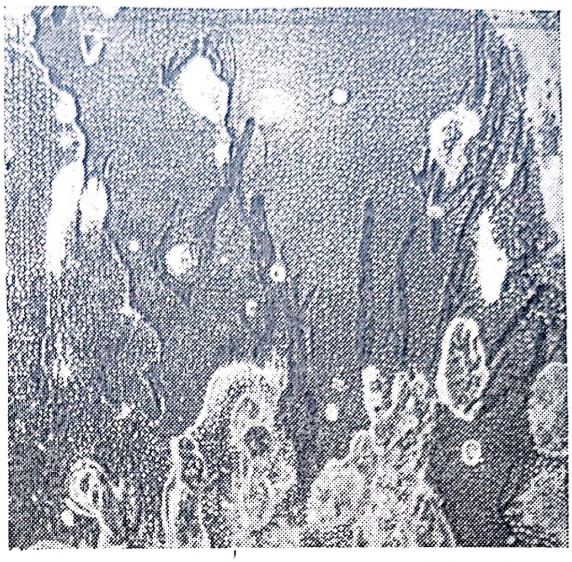


Fig. 430. Aspectul unei foi de celofan atacat de bacteria *Cellvibrio* (celule mici şi rotunde) şi de mucegaiul *Myrothecium* (după Went).

zenţa unor formaţiuni corpusculare intracelulare intens colorabile, care sînt denumite *chişti*, deşi nu au o rezistenţă deosebită de aceea a formei vegetative. La degradarea aerobă a celulozei participă şi unele specii de *actinomicete* ca: *Streptomyces cellulosae*, *S. melanocyclus* etc. care, deşi acţionează foarte lent (2—3 luni), au un randament mare, realizînd degradarea acestui polizaharid în proporţie de 80—90%. În ceea ce priveşte *ciupercile microscopice celulozolitice* ele sînt deosebit de active mai ales în solurile acide de pădure. Proliferarea lor este limitată în solurile mai sărace în azot şi este foarte mult favorizată, datorită cerinţelor lor mari de substanţe cu azot, în solurile care au primit îngrăşăminte azotate. Speciile capabile de celulozoliză aerobă sînt foarte numeroase şi aparţin genurilor *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fussarium*, *Monosporium*, *Penicillium* ş.a. În cursul descompunerii aerobe a resturilor vegetale există două faze în ceea ce priveşte predominanţa microflorei celulozolitice: *a) degradarea* părţilor mai uşor atacabile ale resturilor vegetale, realizată în special de bacterii din genurile *Cellvibrio*, *Myxococcus* ş. a.; *b) descompunerea* părţilor mai rezistente la degradări, datorită mai ales speciilor de *Cytophaga* şi ciupercilor microscopice.

În ceea ce priveşte biochimia celulozolizei aerobe, microorganismele active care se dezvoltă direct pe fibrele de celuloză de care se fixează, produc hidroliza enzimatică a celulozei, în cursul căreia fibrele îşi pierd consistenţa, se umflă şi se transformă într-o masă cu o consistenţă păstoasă şi gelatinoasă. Din această hidroliză rezultă glucoză şi celobioză, care, la rîndul ei, este descompusă în glucoză. Aceşti compuşi apar însă numai excepţional în sol, deoarece procesele biochimice de degradare merg pînă la stadiile de combustie a glucozei care poate fi incompletă, cu descompunerea ei în acizi şi alcooli,

sau completă, cu eliberarea produşilor finali CO_2 şi H_2O. Celulozoliza aerobă decurge deci în mai multe etape succesive: la început se produce hidroliza celulozei pînă la *celobioză* ($C_{12}H_{22}O_{11}$) şi la alţi produşi mai complecşi, sub acţiunea celulazelor microbiene. Prin oxidarea acestor produşi se formează ulterior *acizi uronici*. Dacă hidroliza celulozei este mai puternică, mergînd pînă la formarea *glucozei*, aceasta este oxidată mai departe la CO_2 şi H_2O, trecînd prin stadiul intermediar de oxiacizi:

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O + xO_2 \rightarrow R—CHOH \cdot COOH \rightarrow CO_2 + H_2O + x \text{ kcal.}$$

Formarea de hidrocarbonate solubile şi de oxiacizi ca produşi intermediari în degradarea celulozei are o importanţă foarte mare în sol, deoarece stimulează intens dezvoltarea fixatorilor de N care îi folosesc ca hrană. Degradarea aerobă a celulozei se realizează în condiţii optime în solurile bine lucrate, aerobe, bogate în N şi la un climat temperat. În aceste condiţii, bacteriile, actinomicetele şi ciupercile celulozolitice sînt active pînă la adîncimea de 30 cm de la suprafaţa solului, ceea ce corespunde zonei practic utile pentru dezvoltarea culturilor de la suprafaţa solului.

Degradarea anaerobă a celulozei se realizează în special în regiunile mai profunde ale solului, în cazul cînd resturile vegetale sînt depuse în mase compacte, dense, neaerate, în solurile umede şi saturate cu apă, în regiunile tropicale etc. Datorită dificultăţilor de izolare în cultură pură, microorganismele celulozolitice anaerobe sînt puţin studiate. Cunoaşterea lor se limitează obişnuit la speciile genului *Caduceus* ca, de exemplu, *C. cellulosae hydrogenicus*, care fermentează celuloza cu degajare de H_2 şi CO_2, *C. cellulosae methanicus*, care liberează metan, *C. cellulosolvens* şi altele. Aceste bacterii sînt anaerobe facultative sau stricte, în acest din urmă caz acţiunea celulozolitică exercitîndu-se numai în anaerobioză.

Din punct de vedere biochimic, degradarea anaerobă a celulozei constă din hidroliza celulozei sub acţiunea celulazelor şi celobiazei microbiene cu formare de glucoză, din descompunerea căreia rezultă acizi volatili (formic, butilic, acetic), nevolatili (succinic, lactic), alcool etilic şi butilic şi gaze (CO_2, H_2). Fermentarea celulozei cu degajare de H_2 este însoţită de formarea acizilor butiric şi acetic şi a CO_2, după reacţia:

$$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH + CH_3COOH + \\ + CO_2 + H_2 + x \text{ kcal.}$$

În ceea ce priveşte aşa-numita „fermentaţie metanică" a celulozei, cercetări mai noi au arătat că CH_4 — considerat anterior ca unul din produşii direcţi ai celulozolizei anaerobe — reprezintă de fapt un produs secundar format sub acţiunea nu a microflorei celulozolitice, ci a unor microorganisme asociate care utilizează acidul acetic sau H_2 derivaţi din celulozoliză, conform reacţiilor:

$$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \quad \text{sau} \quad CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 + 4\,H_2.$$

Unele specii de bacterii celulozolitice anaerobe sînt adaptate să trăiască în intestinul uman sau animal, unde determină descompunerea celulozei din ali-

mente cu formarea de acid formic, acetic şi de gaze. Datorită faptului că aceste microorganisme au nevoie pentru creşterea lor de o substanţă azotată, aflată într-o anumită treaptă de degradare, proprie pentru fiecare gazdă, ele nu se pot dezvolta decît în prezenţa unui extract de conţinut digestiv al gazdei obişnuite. Deoarece în condiţii naturale această degradare a substanţelor azotate este adusă la stadiul necesar tot de microorganisme, bacteriile celulozolitice trăiesc în asociaţie cu alte bacterii care, pe de o parte, îmbogăţesc conţinutul intestinal în compuşii organici azotaţi amintiţi, iar pe de alta, micşorează potenţialul de oxido-reducere al mediului, creînd condiţii favorabile de anaerobioză. Dintre speciile de bacterii celulozolitice anaerobe, adaptate să trăiască în tubul digestiv, fac parte, de exemplu, *Caduceus cellulosae dissolvens*, adaptat la intestinul uman, şi *Cl. cellulolyticum*, izolat din rumenul rumegătoarelor.

Microorganismele celulozolitice termofile sînt foarte răspîndite în natură în medii bogate în celuloză şi în N organic şi mineral, cum sînt guţoiul de grajd şi nămolurile. Din această categorie de microorganisme fac parte: *1) bacteriile anaerobe sporulate: Terminosporus thermocellus* şi *T. thermocellulolyticus*, care, în condiţii optime degradează celuloza cu formare de acizi volatili şi nevolatili, alcooli şi gaze; *2) actinomicete* din genurile *Streptomyces (S. thermophylus* şi *S. thermofuscus)* şi *Micromonospora (M. fusca, M. vulgaris*, active între 28 şi 65°C); *3) ciupercile* din genul *Thermomyces* (temperatura optimă 50°C), care sînt polifage, putînd degrada şi hemicelulozele şi lignina.

În afară de acţiunea lor din sol, a cărei importanţă în circulaţia carbonului în natură este esenţială, microorganismele celulozolitice pot avea şi unele acţiuni dăunătoare ca, de exemplu, aceea de degradare a hîrtiei, degradare care pune uneori în pericol grav cărţile rare şi documentele din arhive şi biblioteci. Această acţiune este mai frecvent întîlnită în depozite rău încălzite, întunecoase şi prost ventilate. Hîrtia atacată prezintă pete colorate, care uneori confluează, şi devine friabilă.

b. Degradarea microbiană a hemicelulozelor

Hemicelulozele sînt combinaţii ale ozelor (pentoze, hexoze) cu acizii uronici şi sînt desemnate corect ca pentozani (arabani, xilani) dacă sînt formate din pentoze şi hexozani (glucani, manani, galactani, fructani) cînd molecula de construcţie este o hexoză. Prezente în cantităţi mari în paie, ele reprezintă în genere 6—30% din compoziţia ţesuturilor vegetale. Degradarea lor este datorită unei microflore nespecifice, reprezentată de microorganisme celulozolitice polifage.

c. Degradarea biologică a ligninei

Lignina este o substanţă cu structură chimică încă necunoscută precis (presupusă a fi un polimer de fenil propan), care intră în alcătuirea pereţilor celulari ai ţesuturilor lemnoase. Formată în cursul dezvoltării plantei prin procesul

de „lignificare" a celulozei din peretele celular, ea poate reprezenta pînă la 30% din greutatea uscată a organismului vegetal.

Lignina este o substanţă rezistentă la degradare şi, ca atare, se acumulează în sol. Complexul ligninocelulozic este degradat de ciupercile care produc putregaiul brun al lemnului *(Polystictus versicolor, Pleurotus ostreatus, Psalliota campestris)*, care folosesc celuloza ca substrat nutritiv şi de cele care produc putregaiul alb *(Polyporus abietinus, Poria subacida)*, care degradează lignina cu ajutorul fenol-oxidazei.

4. INTERRELAŢII ÎNTRE MICROORGANISME ŞI PLANTELE SUPERIOARE

Plantele superioare, prin intermediul rădăcinilor lor, exercită o influenţă importantă şi complexă asupra echilibrului dinamic al microflorei din sol.

În primul rînd, ele au un efect desicant şi de scădere a concentraţiei constituenţilor minerali ai solului, datorită faptului că absorb apa şi diferite substanţe minerale dizolvate. În afară de aceasta, în timpul creşterii plantelor, rădăcinile care pătrund în sol îşi modifică structura, influenţînd astfel circulaţia apei şi a gazdelor printre particulele sale, absorb O_2 şi liberează CO_2, mărind prin aceasta cantitatea de carbonaţi din sol, şi lasă să difuzeze substanţe cu caracter enzimatic, energetic şi auxinic, ceea ce schimbă compoziţia mediului de viaţă al microorganismelor.

După moartea plantelor, rădăcinile rămase în pămînt şi părţile lor aeriene căzute la suprafaţa acestuia îl îmbogăţesc în substanţe organice nutritive, care reprezintă substratul activităţii vitale a microflorei din sol.

La rîndul lor, microorganismele influenţează dezvoltarea plantelor datorită capacităţii lor de a mineraliza substanţele organice şi de a solubiliza sau insolubiliza diferitele substanţe minerale, ca şi prin fixarea N_2 molecular şi prin punerea în libertate a unor compuşi intermediari de sinteză sau de autoliză care pot fi utilizaţi direct de plante.

Rizosfera. Zona celei mai intense activităţi biologice din sol este reprezentată de regiunea de contact dintre rădăcini şi sol, rizosfera (Hiltner, 1904), în care interrelaţiile microfloră-plante sînt deosebit de intense.

Efectele cele mai puternice din partea plantei se produc pe suprafaţa rădăcinii şi în solul aflat în imediată apropiere cu ea, dar se pot extinde pe o distanţă variabilă, în funcţie de natura solului şi de plantă.

Din acest punct de vedere, în cadrul rizosferei se disting trei zone: *1) rizosfera apropiată — rizoplanul* sau *histosfera*, corespunzînd însăşi suprafeţei rădăcinii, la nivelul căreia se găsesc microorganismele radiculare; *2) zona periradiculară*, reprezentată de pămîntul aderent la suprafaţa rădăcinilor pe o rază de 0,5 cm, populată de microorganismele periradiculare; *3) rizosfera îndepărtată* sau *edafosfera*, extinsă pe o distanţă de maximum 50 cm în jurul rădăcinii, populată de microorganismele rizosferice.

Cele mai multe microorganisme din rizosferă sînt saprofite. Unele trăiesc pe suprafaţa rădăcinilor, în timp ce altele pătrund în interiorul lor, la nivelul

celulelor corticale sau chiar mai adînc. Unele dintre aceste microorganisme nu au nici o influenţă asupra plantei, în timp ce altele pot exercita asupra ei acţiuni favorabile sau dăunătoare.

a. Acţiunea rizosferei asupra microorganismelor din sol

Prezenţa rizosferei determină o creştere considerabilă a microflorei totale a solului, în special pe seama bacteriilor, şi, în mai mică măsură, pe seama actinomicetelor şi a ciupercilor microscopice. Intensitatea influenţei exercitate de rădăcină asupra microorganismelor (aşa-numitul „efect de rizosferă") poate fi apreciată cantitativ prin raportarea numărului total de microorganisme din rizosfera unei plante („R") la numărul total al microorganismelor din restul solului („S"). Valoarea raportului *R/S* variază între 10 şi 100. Acest efect este maxim în zonele adiacente rădăcinii, în special la nivelul perilor radiculari şi în orizonturile superficiale ale solului, şi diminuează treptat, proporţional cu distanţa, pe măsura îndepărtării de rădăcină (tab. 28). De asemenea, „efectul de rizosferă" este foarte intens în apropierea vîrfului rădăcinilor laterale, deoarece în zona de alungire a rădăcinii şi în celulele perilor radiculari activitatea metabolică este intensă, permeabilitatea pereţilor celulari este crescută, iar secreţiile radiculare se găsesc în cantitatea şi cu varietatea calitativă cea mai mare. Pe de altă parte, influenţa rizosferei se manifestă progresiv, paralel cu dezvoltarea plantei, fiind maximă în momentul fructificării, după care scade în cursul vestejirii şi dispare rapid după moartea plantei. Această influenţă variază, de asemenea, de la o specie de plantă la alta.

Efectul cel mai evident al prezenţei rizosferei constă în favorizarea *creşterii numerice* a germenilor care au nevoie de aminoacizi pentru multiplicare, comparativ cu cei care pot creşte pe medii strict minerale. Aceasta se datoreşte faptului că, pe lîngă vitamine, zaharuri, alcaloizi, substanţe stimulente etc., plantele liberează în sol şi numeroşi acizi aminaţi ca acid glutamic, acid aspartic, leucină, alanină, cisteină, glicină, lizină, prolină, fenilalanină, tirozină, triptofan, metionină ş.a. Secreţiile radiculare mai conţin numeroase zaharuri (arabinoză, glucoză, galactoză, maltoză, fructoză, xiloză, riboză şi dezoxiriboză),

TABELUL 28

VARIAŢIILE NUMERICE ALE MICROFLOREI ÎN FUNCŢIE DE DISTANŢA DE RĂDĂCINA, LA GRÎU, FASOLE ŞI SFECLĂ
(după Starkey, 1933)

Distanţa la rădăcină	Nr. bacterii pe gram/sol		
	Grîu	Sfeclă	Fasole
Pe suprafaţă	25×10^7	30×10^7	9×10^7
La 0,2 cm	5×10^7	3×10^7	$2,7 \times 10^7$
La 15 cm	3×10^7	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
La 35 cm	2×10^7	$1,8 \times 10^7$	2×10^7
La 50 cm	2×10^7	$1,5 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$

Scanned with OKEN Scanner

precum şi o serie de acizi organici (acizii citric, lactic, malic, oxalic, succinic ş. a.). Populaţia microbiană din rizosferă diferă de aceea din restul solului şi sub raport *calitativ*, în ceea ce priveşte compoziţia ei în specii, care de altfel este în permanentă schimbare, fiind influenţată de metabolismul rădăcinii, la rîndul său condiţionat de natura solului, de factorii atmosferici (temperatură, umiditate), de vigoarea şi perioada de creştere a plantei. În sfîrşit, microorganismele din rizosferă sînt *fiziologic mai active* decît cele din restul solului, fapt care se manifestă evident şi atunci cînd sînt cultivate pe medii artificiale.

Influenţa plantei asupra microorganismelor din sol începe să se manifeste chiar din momentul germinării seminţelor, cînd diferitele substanţe eliberate în mediu în cursul acestui proces (glucomanani, glucogalactani, aminoacizi) creează în jurul seminţei pe cale de germinare o zonă de influenţă beneficială pentru dezvoltarea microorganismelor, zonă care, prin analogie cu rizosfera, a fost numită *spermosfera* (V e r o n a).

b. Influenţa microorganismelor din rizosferă asupra plantelor

Rizosfera reprezintă mediul unei activităţi microbiene intense în cursul căreia microorganismele transformă substanţele organice şi anorganice, exercită un efect de *solubilizare* a substanţelor nutritive şi de formare a unor produşi anorganici noi. Datorită CO_2 de origine microbiană, se măreşte de asemenea acţiunea solubilizantă a secreţiilor radiculare asupra carbonatului de calciu. *Prezenţa şi activitatea microorganismelor în rizosferă grăbesc astfel creşterea plantei şi asigură dezvoltarea ei viguroasă.* Microorganismele influenţează plantele şi prin acţiunea lor de *modificare a structurii solului.* De asemenea, ele pot elibera în cursul metabolismului lor în sol diferiţi produşi volatili (etilen, alte hidrocarburi, metiltiol, dimetildisulfură ş. a.) capabili să stimuleze creşterea rădăcinilor, dezvoltarea perilor radiculari, anumite reacţii geotrope ale rădăcinilor etc. În sfîrşit, microorganismele ar exercita şi un rol *„sanitar"*, descompunînd diferite substanţe toxice, a căror acumulare în sol ar putea determina moartea plantelor. În afară de aceste influenţe favorabile, microorganismele rizosferei pot exercita unele acţiuni *nocive* pentru plantă, utilizînd substanţele nutritive accesibile acesteia sau chiar parazitînd-o (microorganismele fitopatogene).

Importanţa rizosferei este uşor de dedus dacă ţinem seama că, după unele calcule (H. D i t t m e r), sistemul radicular al secarei bine înfrăţite atinge în timpul înspicării o lungime de circa 600 km cu o suprafaţă de aproximativ 225 m^2. Pe aceste rădăcini se găsesc aproape 15 miliarde peri absorbanţi, cu lungime de circa 10 000 km şi o suprafaţă de 400 m^2. În concluzie, planta, solul şi microorganismele alcătuiesc, în special la nivelul rizosferei, un adevărat *sistem ecologic,* ale cărui părţi componente sînt legate între ele prin interrelaţii foarte complexe.

c. Micorizele

Sub denumirea de micoriză (*mikis* = ciupercă; *riza* = rădăcină) se înţelege o *asociaţie de tip beneficial* între o ciupercă filamentoasă şi rădăcinile sau rizoizii unor plante. Prezenţa micorizelor se exteriorizează prin apariţia pe rădăcinile sublaterale ale plantei-gazdă a unor excrescenţe scurte şi ramificate, care înlocuiesc perii absorbanţi şi formează o împîslire de miceliu fungic, alcătuind cu timpul un adevărat „manşon periradicular", colorat variabil, de la alb la brun sau negru. Rădăcinile invadate de ciuperci sînt mai scurte decît cele normale şi prezintă o hipertrofie a celulelor corticale.

Micorizele sînt *asociaţii temporare*, deoarece ciupercile mor la sfîrşitul perioadei de creştere vegetativă a plantei. Ciupercile care constituie micorize au o poziţie sistematică diferită, putînd face parte din clasele *Phycomycetes*, *Basidiomycetes*, *Ascomycetes* sau din genurile *Phoma* şi *Rhizoctonia* din grupul „fungilor imperfecţi". Micorizele au fost semnalate la numeroase plante ca, de exemplu, la criptogame avasculare (muşchii frunzoşi şi hepatici), criptogame vasculare (*Lycopodium*) şi fanerogame, atît gimnosperme (conifere: *Pinus*), cît şi angiosperme (graminee, liliacee, orhidee, fagacee, rosacee etc.).

După raporturile dintre ciupercă şi rădăcina plantei micorizele sînt de trei tipuri: *ectotrofe*, *endotrofe* şi *ectoendotrofe*.

1) *Micorizele ectotrofe* — în care ciuperca rămîne în special externă, formînd un înveliş ca un manşon în jurul rădăcinilor, reprezintă, în realitate, un caz de ectotrofie parţială, deoarece hifele pătrund totuşi în stratul cortical al rădăcinii la nivelul spaţiilor intercelulare, fără să producă infecţii intracelulare. Ele sînt întîlnite constant la coniferele, fagii şi stejarii din păduri, mai ales în regiunile temperate, dar sînt foarte rare la aceiaşi arbori atunci cînd ei sînt izolaţi, rari, ca în fîneţe, păşuri sau terenuri agricole.

2) *Micorizele endotrofe* — în care miceliul ciupercii se dezvoltă aproape exclusiv în interiorul celulelor corticale ale gazdei — sînt frecvente la plantele ierboase şi lemnoase. De obicei, prezenţa ciupercii nu este evidentă macroscopic decît cel mult indirect, prin tuberizarea rădăcinii la unele plante (orchidee). De cele mai multe ori aceste micorize pot fi decelate numai la examenul microscopic al celulelor corticale ale rădăcinii, în care formează structuri caracteristice denumie „arbusculi" şi umflături terminale, „vezicule", considerate ca organe în care se depun grăsimi de rezervă. Pe măsură ce ciuperca se dezvoltă, creşterea în lungime a radicelelor infectate este inhibată, iar perii absorbanţi dispar. În cele din urmă, ramificaţiile în formă de arbusculi, situate în grosimea parenchimului cortical, sînt, la rîndul lor, digerate de celula radiculară infectată. Aceasta sugerează că în timp ce micorizele ectotrofe evoluează cu particularităţile unei simbioze adevărate, cele endotrofe apar mai curînd ca o formă de *parazitism controlat*. Într-adevăr, ca răspuns la infecţie, planta se apără sintetizînd două substanţe antifungice, *orchinol* şi *hirchinol*, care apar numai în celulele infectate unde au rolul de a controla evoluţia infecţiei.

3) *Micorizele ectoendotrofe* sau *peritrofe*, care reprezintă o formă de tranziţie, sînt caracterizate prin aceea că, pe lîngă aspectul ectotrof reprezentat de

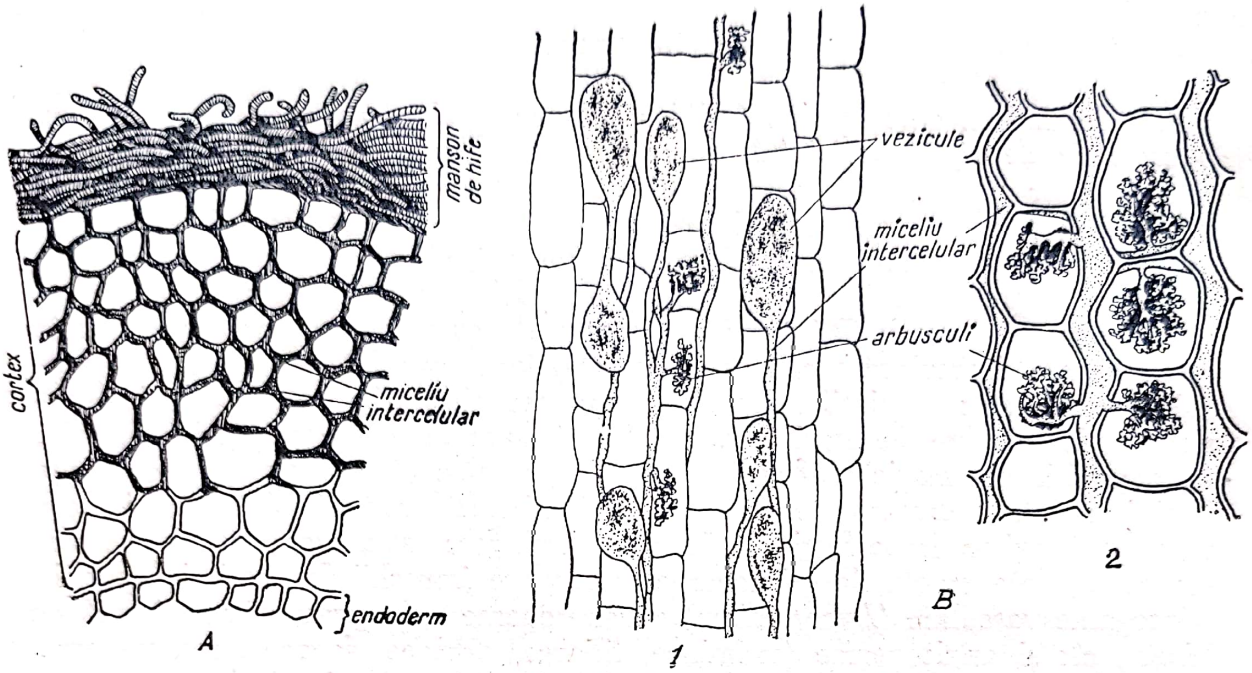


Fig. 431. Secţiune transversală printr-o rădăcină cu micorize:
A — micorize ectotrofe; *B* — micorize endotrofe: *1* — structuri veziculo-arbusculare; *2* — detaliu de structură a arbusculilor (după Pochon).

dezvoltarea abundentă a ciupercii în rizosferă şi la suprafaţa rădăcinii, se observă şi pătrunderea hifelor în celulele radiculare.

Interrelaţiile dintre ciuperci şi plante în micorize. Prezenţa micorizelor are asupra dezvoltării plantelor un efect favorabil care se exercită printr-un mecanism complex, constînd din:

1) Favorizarea absorbţiei apei în plantă, a elementelor minerale şi chiar a unor molecule organice mici, prin aceea că ciupercile din micoriză măresc suprafaţa absorbantă a rădăcinilor, stimulînd creşterea ramificaţiilor şi împiedicînd suberificarea lor.

2) Intensificarea activităţii metabolice generale a plantei căreia ciupercile îi furnizează azotul sub formă de acid glutamic; în prezenţa azotului amoniacal, plantele de *Pinus* cu micorize au un conţinut în azot dublu faţă de acela al plantelor fără micorize, datorită faptului că sărurile de NH_4 pătrund în cantitate mare în ciupercă, de unde trec în arbore.

3) Crearea posibilităţii de folosire de către plantă a unor substanţe greu solubile care conţin N şi P, prin solubilizarea lor datorită ciupercii.

4) Absorbţia din sol, prin intermediul hifelor, a substanţelor nutritive necesare plantei, metabolizarea şi transportul lor de către ciupercă în ţesutul cortical al rădăcinii, proces datorită căruia plantele cu micoriză se dezvoltă mai bine decît cele neinfectate.

Ca urmare a acestor relaţii simbiotice, plantele cu o micoriză bine dezvoltată cresc mai bine decît cele fără micorize. Ele sînt, de obicei, mai înalte, mai viguroase, au o tulpină mai groasă şi frunze de culoare verde-închis. Plantele nu sînt însă dependente în egală măsură în ceea ce priveşte dezvoltarea lor,

de prezenţa ciupercilor. În timp ce pentru unele plante microzele sînt absolut indispensabile, condiţionîndu-le dezvoltarea, la altele prezenţa şi gradul de dezvoltare a micorizelor influenţează numai vigoarea plantei, iar anumite specii (pomii fructiferi) se dezvoltă bine şi în absenţa micorizelor. Influenţa favorabilă a micorizelor asupra dezvoltării plantelor a fost observată în condiţii de teren, la plantarea coniferelor în unele soluri virgine care nu conţineau ciuperci de micorize. Cu această ocazie s-a demonstrat că nu reuşeau decît dacă se plantau arbori infectaţi sau dacă seminţele se amestecau cu humus contaminat cu ciuperci de micoriză ori cu culturi fungice de pe medii artificiale.

În cazul micorizelor ectotrofe, asociaţia este beneficială şi pentru ciuperci, care dobîndesc pe această cale un habitat adecvat cu caracter permanent şi preiau din organismul plantei-gazdă diferite substanţe nutritive ca glucide, vitamine şi factori de creştere sintetizaţi de plantă în cursul fotosintezei. Întrucît fungii micorizelor ectotrofe nu se găsesc în natură decît asociaţi cu rădăcinile arborilor, Melin (1963) consideră că ei nu-şi pot obţine altfel hrana necesară pentru creştere. Exsudatele radiculare prin unii dintre constituenţii lor, cum ar fi factorul *M*, stimulează creşterea fungilor asigurînd astfel o dezvoltare adecvată miceliului şi formarea micorizei, iar prin acţiunea altor componente exercită în acelaşi timp un efect inhibator asupra ciupercii, menţinînd dezvoltarea ei în limite tolerabile pentru viaţa normală a plantei. Asociaţiile de tipul micorizelor se constituie, cel mai frecvent, în soluri deficiente în substanţe nutritive; formarea acestor asociaţii este însă inhibată în solurile bogate în P şi N, populate cu plante care fotosintetizează intens, fiind expuse la lumină puternică în tot cursul zilei.

Fungii micorizelor endotrofe au capacitatea de a degrada celuloza şi lignina, furnizînd astfel plantelor, în special celor imature, substanţe necesare pentru creştere. Spre deosebire de cei ai micorizelor ectotrofe, ei se pot dezvolta şi independent de plante. Beneficiul lor din convieţuirea cu planta pare minim şi, după unii autori (Brock, 1967), acest tip de micorize ar reprezenta o asociaţie în care planta ar folosi integral activitatea fungilor în favoarea sa.

5. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA ŞI EVOLUŢIA HUMUSULUI

Humusul este un complex de substanţe amorfe în stare coloidală, rezultat din transformări biochimice (descompuneri şi sinteze) ale resturilor organice vegetale şi animale, sub acţiunea microflorei din sol.

Compoziţia chimică a humusului. Constituenţii humusului au dimensiuni moleculare variate, sînt de natură predominant aromatică, avînd caracter fenolic, chinoic sau cetonic, şi reprezintă heteropoli condensate cu mare rezistenţă la atacul microbian. Deşi humusul are în natură o importanţă majoră, fiind factorul esenţial al fertilităţii solurilor, natura chimică, proprietăţile fizico-chimice şi modul său de formare sînt incomplet cunoscute.

Constituenţii humusului sînt substanţe de natură variabilă, complexă şi eterogenă. Ei nu pot fi definiţi prin nici o formulă chimică dar sînt caracteri-

zaţi prin prezenţa unui nucleu aromatic central, foarte stabil din punct de vedere biochimic, care le conferă structura fundamentală de acizi humici, de care se leagă, în proporţii variabile şi prin legături labile, diverse molecule de glucide sau aminoacizi. *Acizii humici* se deosebesc între ei din punct de vedere fiziochimic (prin compoziţie chimică, dimensiuni moleculare, solubilitate, grad de dispersie), în funcţie de condiţiile în care s-a produs humificarea substanţei organice de origine. De exemplu, uscăciunea periodică favorizează formarea de acizi humici cu moleculă complicată, iar umiditatea în exces numai pe aceea a unor molecule mici de humus.

Prin tratarea succesivă a solului cu alcali, acizi şi alcooli au fost identificaţi o serie de constituenţi chimici ai humusului, ca *humina* sau *ulmina* (cărbunele humic), *acizii fulvici* (crenici) galbenii-cenuşii şi *acizii huminici* bruni-negri (formaţi din acid himatomelanic, solubil în alcool şi acizi humici, insolubili în alcool). Proporţia elementelor în compuşii humici variază după originea şi modul de formare al acestora, între 52 şi 62%: C, 2,5 şi 6,0% H, 30 şi 40% O 0—6,0% N. Acizii fulvic, himatomelanic şi humic nu sînt grupuri independente de compuşi humici, ci reprezintă o serie uniformă de stadii de tranziţie în evoluţia humusului, iar huminele sînt probabil acizi humici în combinaţii strînse cu substanţele minerale din sol.

Una dintre particularităţile cele mai importante ale substanţelor humice este aceea de a fi mai *stabile*, în condiţii termodinamice date, decît substanţele naturale din care s-au format. În acelaşi timp, ele sînt într-o permanenţă evoluţie: pe de o parte, pornind de la diferite substanţe organice animale şi vegese formează substanţe noi sub acţiunea microorganismelor, iar pe de altă parte, complexele humice sintetizate şi depozitate sînt mineralizate de microflora solului. Datorită acestui proces continuu, formarea humusului se poate afla în diferite stadii de evoluţie: *a*) *substanţe prohumice*, capabile să agrege particulele de sol; *b*) *humus activ*, cel mai important pentru fertilitate, deoarece prin descompunere formează uşor substanţe nutritive pentru plante (reprezintă aproximativ 1% din greutatea solului); *c*) *humus stabil*, care cimentează bulgării de sol, dar se descompune greu şi nu participă activ în nutriţia plantelor; *d*) *humus inactiv*, cu capacitate redusă de mineralizare şi fără rol în nutriţia plantelor ca şi în formarea structurii stabile a agregatelor de sol.

Formarea humusului. Modul în care humusul derivă din resturile organismelor moarte nu a fost explicat pînă în prezent. Caracterul mai complex şi conţinutul mai bogat în N al substanţelor humice, comparativ cu substanţele de origine, pledează pentru ideea că humusul este în special un *produs de sinteză*. În acord cu *teoria microbiologică*, procesele de degradare şi sinteză care au drept rezultat formarea complexelor humice se datoresc acţiunii bacteriilor aerobe şi anaerobe, a actinomicetelor şi a ciupercilor microscopice.

Substanţele organice vegetale şi animale ajunse în sol după moartea organismelor nu sînt în întregime supuse unei degradări complete pînă la produşi finali (CO_2, H_2O, NH_3). O parte din ele sînt degradate numai parţial şi sub această formă sînt apoi folosite pentru sinteza de produşi noi, mai mult sau mai puţin rezistenţi la descompunerea microbiană — substanţele humice — care se acumulează în cantităţi mari, ca rezerve, condiţionînd proprietatea

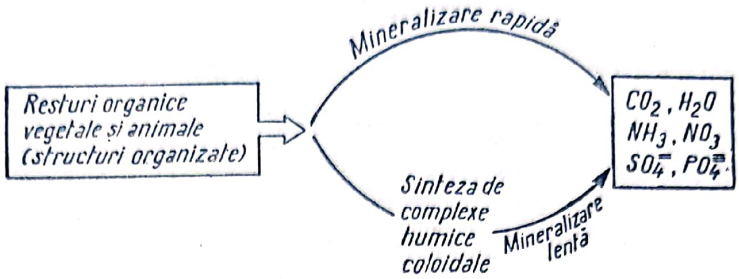


Fig. 432. Reprezentare schematică a rolului microorganismelor în formarea și degradarea substanțelor humice.

cea mai importantă a solului, fertilitatea. În felul acesta, pe lîngă acțiunea lor de distrugere a substanțelor organice animale și vegetale, microorganismele contribuie la formarea unor tipuri noi de substanțe organice. Acest proces s-ar realiza, după P a u l i, în două etape: *a*) inițial, în *etapa de mineralizare*, în anumite condiții, structurile parietale ale celulelor vegetale și țesuturile animale ar fi degradate de microorganisme numai parțial, pînă la blocurile lor specifice de construcție, cu greutatea moleculară redusă, care ar constitui precursorii substanțelor humice. Constituenții humusului s-ar forma apoi tot în urma unor activități microbiene, prin polimerizarea și condensarea acestor precursori, în cursul procesului de humificare; *b*) paralel cu degradarea enzimatică a substanțelor organice, microorganismele din sol efectuează și *sinteza unor compuși noi* — substanțele humice — care se acumulează temporar în sol, formînd adevărate rezerve de C,N, P, S, K ș. a. absolut necesare vieții în sol.

Microorganismele participă însă nu numai la formarea substanțelor humice de rezervă, ci și la descompunerea lor lentă, prin care se asigură plantelor elementele indispensabile pentru noile sinteze organice. Aceste transformări, în care microorganismele au un rol esențial se fac după schema din figura 432.

Sinteza microbiană a compușilor humici se realizează atît în aerobioză cît și în anaerobioză.

Sinteza aerobă a substanțelor humice are loc în straturile superficiale ale solului și numai în cazul în care acumularea substanțelor organice vegetale s-a făcut în masă afînată. Ea este efectuată de bacterii, în cazul resturilor de plante ierboase, și de ciupercile microscopice, atunci cînd substanțe organică provine din plante lemnoase. Rezultă acizi humici care nu omoară microorganismele, deoarece sînt neutralizați de NH_3, format în cursul procesului de humificare.

Sinteza anaerobă este rezultatul acțiunii microorganismelor asupra substanțelor organice acumulate în profunzimea solului sub formă de mase dense. Procesul este inhibat în momentul în care cantitatea de acid ulminic este atît de mare încît oprește dezvoltarea microorganismelor respective și este reluat după degradarea acestui acid. În condiții naturale, denaturarea acidului ulminic se produce iarna sub acțiunea frigului. Datorită acestui fapt, sinteza anaerobă a compușilor humici are un caracter periodic, fiind mai activă primăvara și vara și scăzînd ca intensitate spre toamnă. Acest proces reprezintă forma cea mai importantă de acumulare a substanțelor humice în natură.

Scanned with OKEN Scanner

F r a i g (1964) explică formarea substanţelor humice prin degradarea lignei la chinone astfel: *lignina* $\xrightarrow[\text{demetilare}]{\text{oxidare}}$ *fenoli* $\xrightarrow{\text{oxidare}}$ *chinone;* acizii humici ar rezulta din condensarea cu aminoacizi a chinonelor astfel formate. Cercetări efectuate cu ajutorul izotopului C^{14} au arătat, pe de altă parte, că unele substanţe ca lignina şi proteinele sînt humificabile direct, fără acţiune microbiană, în timp ce altele, cum sînt glucoza, aminoacizii, celuloza şi hemicelulozele sînt mai întîi metabolizate de microorganisme, după care se produce humificarea materialului microbian. În afară de rolul lor în formarea humusului microbian — derivat din celule microbiene şi produşii lor proveniţi din asimilarea constituenţilor vegetali — microorganismele sau enzimele lor intervin şi în transformarea humusului proaspăt, instabil, în humus stabil.

Rolul humusului în fertilitatea solului. Humusul îndeplineşte în sol numeroase funcţii de importanţă excepţională, din care se poate deduce importanţa acţiunilor microbiene implicate în sinteza şi descompunerea lui. El formează în sol rezerve imense de N, C, P, S, K, Fe, care, după mineralizare prealabilă, pot fi folosite de plante şi reprezintă cel mai important factor al fertilităţii solului. După W a k s m a n, cantitatea de substanţe organice aflate în sol sub formă de humus depăşeşte cu mult pe aceea din corpul tuturor organismelor. Cu mici variaţii sezoniere, cantitatea de humus este relativ constantă şi caracteristică tipului de sol (pentru ţara noastră procentul mediu de humus este de 2,7—2,9 la brune de pădure, 2,5—4,5 la brune roşcate de pădure, 4—5,5 la cernoziomuri etc.). Ţinînd însă seama de faptul că există diferite tipuri de humus, valoarea lui pentru fertilitatea unui sol ţine nu atît de cantitatea cît de calitatea lui.

În linii generale, acţiunea fertilizantă a humusului este o rezultantă a cîtorva dintre proprietăţile sale fizico-chimice esenţiale care influenţează chimismul, caracteristicile fizice şi structura solului. Astfel, humusul favorizează nutriţia plantelor superioare, furnizîndu-le constant substanţe nutritive rezultate din descompunerea lui treptată şi lentă de către microorganisme. Pe de altă parte, el imprimă solului unele particularităţi fizice caracteristice, conferindu-i structura granulară şi o culoare întunecată care, favorizînd absorbţia razelor solare, determină creşterea temperaturii. De asemenea, el reduce vîscozitatea argilelor şi uşurează formarea de agregate, ceea ce ameliorează aerarea şi drenajul solului, mărind în acelaşi timp capacitatea de retenţie a apei în sol. În sfîrşit, humusul influenţează proprietăţile chimice ale solului, prin faptul că menţine echilibrul general între ionii adsorbiţi şi cei dizolvaţi şi dă solului putere tampon.

În concluzie, prin participarea sa la sinteza şi transformările substanţelor humice, microflora solului îndeplineşte un rol de o importanţă vitală, deoarece, datorită proprietăţilor sale, humusul conferă solului proprietatea lui de bază, *fertilitatea,* care-l deosebeşte de roca sterilă.

6. APLICAŢII PRACTICE ALE MICROBIOLOGIEI SOLULUI; MICROORGANISMELE CA FERTILIZATORI BIOLOGICI („ÎNGRĂŞĂMINTELE" BACTERIENE)

Cunoscîndu-se rolul microorganismelor în ridicarea productivităţii solului, s-a căutat să se realizeze îmbogăţirea solurilor cu microorganisme active cultivate în laborator. S-au folosit în acest scop bacterii de nodozităţi sub forma unui amestec de specii active pentru fiecare plantă leguminoasă în parte (preparatul **Nitragin**), culturi de *Azotobacter chroococcum* (preparatul **Azotobacterin**), culturi de *B. megaterium* var. *phosphaticus*, care are proprietatea de a mări cantitatea de fosfor asimilabil (preparatul **Fosforobacterin**) şi culturi de *B. mucilaginosus* subsp. *siliceus*, care are capacitatea de a desface K din compuşii minerali de care e legat în sol (preparatul **Silicobacterin**).

Eficacitatea „îngrăşămintelor" bacteriene depinde de o serie de factori, între care esenţiali sînt următorii: activitatea (eficienţa) bacteriilor folosite ca îngrăşămînt; capacitatea lor de a se adapta la condiţiile solului în care sînt introduse, unde ar putea intra în competiţie cu flora autohtonă; capacitatea bacteriilor simbiotice de a infecta plantele şi de a stabili relaţii de simbioză cu acestea; calităţile fizico-chimice ale solului tratat.

Efectul favorabil al acestor „îngrăşăminte" se manifestă prin mărirea conţinutului în azot al solului tratat, creşterea recoltei, a masei vegetale verzi ca şi prin ameliorarea culturilor, în special în ceea ce priveşte conţinutul lor în substanţe proteice. Datorită caracterului variabil al componentelor acestui complex de factori, rezultatele aplicării în practică a „îngrăşămintelor" bacteriene sînt foarte deosebite la diferiţii cercetători şi la unităţile agricole care le-au utilizat în practică.

7. IMPORTANŢA MICROORGANISMELOR DIN SOL

1) Microorganismele au un rol important în *formarea structurii* fizice a solului. Este foarte probabil ca agregarea solului, care este un rezultat al activităţii complexului rădăcină-microorganisme, să fie iniţiată de microorganisme, şi anume în special de acelea care secretă substanţe vîscoase şi lipicioase. Faptul este sugerat de unele imagini electronooptice, unde agregatele de sol apar foarte frecvent centrate de o microcolonie bacteriană.

2) Microorganismele contribuie la trecerea permanentă a substanţelor din sol, din forma organică în cea minerală şi invers, reprezentînd prin aceasta un factor primordial al procesului de *circulaţie a materiei în natură*. Asupra substanţelor organice din sol microorganismele exercită prin procese de degradare biologică o acţiune de *mineralizare*, datorită căreia constituenţii ţesuturilor vegetale şi animale sînt aduşi într-o formă utilizabilă în nutriţia plantelor. În ceea ce priveşte substanţele anorganice, microorganismele acţionează în primul rînd prin solubilizarea rezervelor minerale ale solului în forme accesibile plantelor pentru sintezele lor organice. Pe de altă parte, prin procesul

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 29

RANDAMENTUL CULTURILOR VEGETALE ÎN RAPORT CU NUMĂRUL BACTERIILOR ŞI ACTIVITATEA LOR BIOLOGICĂ ÎN DIFERITE TIPURI DE SOL
(după Waksman şi Starkey)

Calitatea solului	Randamentul culturii vegetale	Nr. bacterii	Degajarea CO_2
Foarte fertil	95—100 [1]	95—100 [1]	95—100 [1]
Fertil	80	65	40
Puţin fertil	25	20	25—35

[1] Cifra 100 a fost aleasă pentru a desemna în mod convenţional valorile maxime de raportare.

de fixare biologică a N_2 atmosferic, microorganismele îndeplinesc o funcţie de *sinteză*, introducînd în sol N_2 molecular din atmosferă transpus în formă organică.

3) Microorganismele solului au o importanţă esenţială pentru *nutriţia azotată a plantelor*. Această activitate se realizează cu o intensitate maximă în rizosferă, în care se observă constant o masă microbiană de 10—100 de ori mai mare decît în restul solului şi cu o activitatea metabolică crescută, şi în cazul simbiozei dintre bacteriile din nodozităţi şi plantele leguminoase gazdă.

4) În sfîrşit, ar exista un *raport între microfloră şi fertilitatea solului*, în sensul unei proporţionalităţi directe între fertilitatea şi activitatea microflorei totale a solului şi o relaţie strînsă între puterea nitrificatoare a unui sol, determinată de microflora specifică, şi fertilitatea lui.

În tabelul 29 (după Waksman şi Starkey) se redă raportul dintre randamentul culturilor vegetale şi activitatea biologică a microorganismelor în diferite tipuri de sol (cifra 100 a fost aleasă în mod convenţional pentru a desemna activităţile maxime).

8. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN CIRCULAŢIA MATERIEI ÎN NATURĂ

În natură, organismele vii preiau în mod permanent din sol, din apă şi din atmosferă, cantităţi mari de elemente pe care le folosesc pentru sinteza constituenţilor lor celulari şi pentru obţinerea energiei necesare manifestărilor vitale. Legătura dintre circulaţia biosferică generală a materiei şi substanţa vie se realizează prin activitatea vitală a organismelor fototrofe — plante superioare, alge şi bacterii fototrofe — care, datorită capacităţii lor de a utiliza energie luminoasă, pot sintetiza substanţe organice pornind numai de la CO_2 atmosferic şi apa cu substanţe minerale din sol. Dintre elementele componente ale acestor substanţe minerale, unele au un rol biologic primordial (N, S, P, Fe, K), în timp ce altele sînt indispensabile numai în cantităţi foarte mici (Mn, As, Mo, B, Cu, Zn, Co). De la plante, substanţele organice astfel sintetizate trec sub formă de hrană la animale şi la om, iar după moartea acestora se reîntorc în sol, dar forma organică sub care se găsesc elementele lor constitutive le face neutilizabile ca atare de către plante. La această sărăcire a solului în minerale se adaugă pierderile de elemente provocate în circuitul geologic al materiei în natură, în cursul căruia, prin eroziunea produsă de vînt şi de ploi, compuşii minerali dizolvaţi sînt transportaţi în mări şi oceane, unde sînt folosiţi de vieţuitoarele acvatice, iar după moartea acestora sînt depuşi ca roci sedimentare. Dacă acest proces ar fi continuu, cu toate

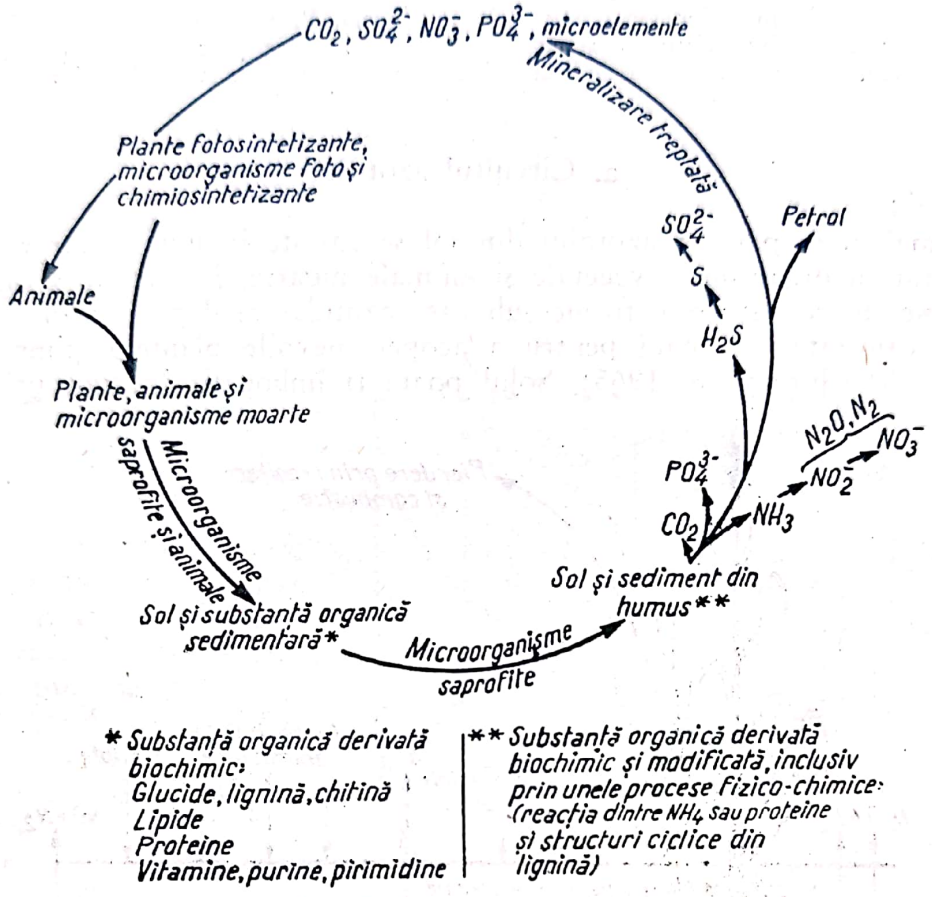


Fig. 433. Rolul microorganismelor în circulația substanțelor organice în natură (după Davis).

că rezervele de elemente biogene existente în natură sînt foarte mari, s-ar ajunge la un moment dat la epuizarea formelor lor utilizabile, situație incompatibilă cu existența organismelor vii pe pămînt. Acest fenomen este însă împiedicat de faptul că microorganismele din sol și din ape, exercitînd o puternică și permanentă acțiune de mineralizare a substanțelor organice de provenienţă vegetală sau animală, menţin constituenţii anorganici și organici din biosferă într-un raport relativ constant. Fără acest proces de mineralizare microbiană, solul ar sărăci în elementele minerale necesare pentru nutriţia plantelor, ceea ce l-ar face complet steril. Mai mult decît atît, unele microorganisme împiedică epuizarea rezervelor de N_2 din sol și ape, fixînd permanent acest element din atmosferă, grație unor capacităţi particulare ale metabolismului lor. Astfel, datorită activităţii plantelor și microorganismelor, diferitele elemente biogene trec alternativ din forma anorganică în forma organică, și invers, într-un circuit în care activitatea microorganismelor — în funcţie de condiţiile biologice ale solului — reglează aceste transformări și asigură echilibrul lor dinamic. De altfel, trarsformările diferitelor elemente nu se produc niciodată în mod izolat, deoarece procesele de circulaţie ale diferitelor componente ale materiei sînt strîns interdependente, evoluînd în cicluri perfect „articulate" între ele.

Circulaţia materiei în natură nu este însă ciclică, în sens strict, cu toate că aceiași atomi reintră permanent în circuit, luînd parte succesiv la alcătuirea diferitelor substanţe, ieșind din sol și reîntorcîndu-se în sol. Circuitul materiei se însoţeşte obligatoriu de dezvoltarea și transformarea formelor ei, evoluînd prin urmare nu în cerc, ci în *spirală*, astfel încît niciodată nu se mai revine la o stare identică întru totul cu cea iniţială. În această circulaţie a materiei în natură, rolul microorganismelor este esenţial. Fără microorganisme n-ar putea

exista plante, iar în lipsa lor viaţa animalelor ar înceta. Prin urmare, microorganismele sînt tot atît de indispensabile vieţii, ca şi sursa de energie pe care o reprezintă soarele, deoarece fără unul dintre aceşti factori nu ar mai exista plante verzi, deci viaţa însăşi ar înceta.

a. Circuitul azotului

Cea mai mare parte a azotului din sol se găseşte în humus, iar restul este încorporat în organismele vegetale şi animale moarte, în excrete şi în microorganisme. În total, aceste forme sub care azotul este depozitat în sol reprezintă o cantitate suficientă pentru a acoperi nevoile plantelor timp de mai mulţi ani (Schreven, 1965). Solul poate fi îmbogăţit în azot prin admi-

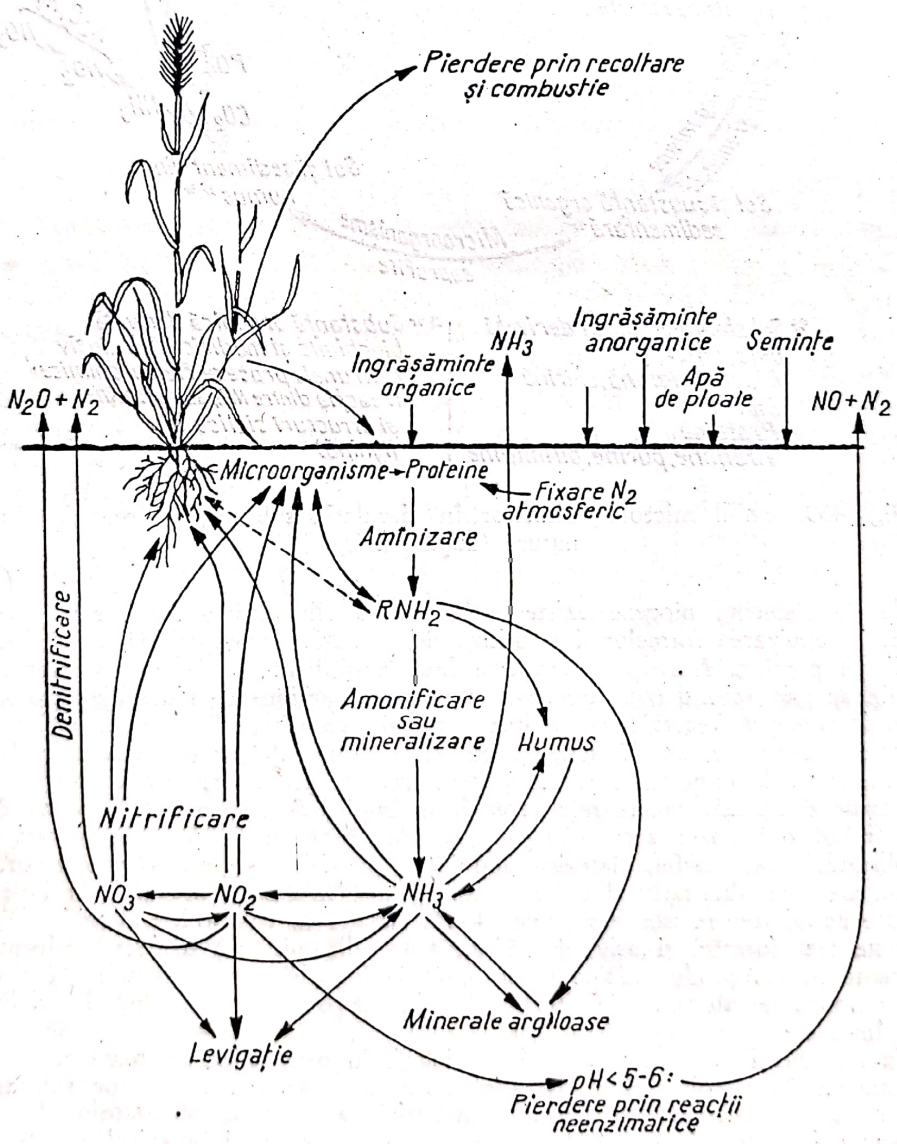


Fig. 434. Circuitul azotului în natură cu indicarea rolului proceselor microbiene din sol (după Van Schreven).

nistrarea de îngrăşăminte organice, prin aportul apei de ploaie (1—10 kg/ha/an) prin absorbţia de NH_3 din atmosferă şi prin resturile vegetale. În acelaşi timp, solul suferă pierderi importante de azot prin levigaţie, prin eliberarea lui sub formă de NH_3 în urma unor reacţii chimice neenzimatice şi mai ales a procesului de denitrificare, precum şi prin recoltarea produselor vegetale.

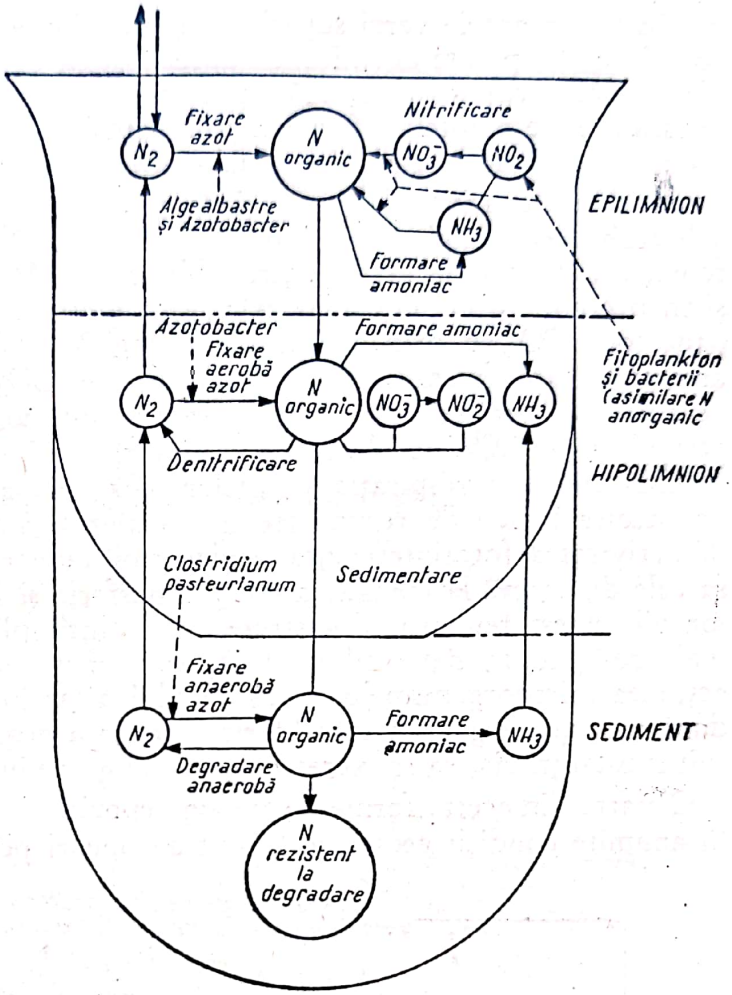


Fig. 435. Reprezentare schematică a proceselor microbiene în circulaţia azotului în lacuri (după Kuzneţov)

Cea mai mare rezervă de azot din natură constă însă în azotul molecular atmosferic care reprezintă aproximativ 8.10^4 tone deasupra fiecărui hectar de pămînt. Inutilizabil sub această formă, pentru plantele superioare şi pentru animale, azotul atmosferic este introdus în sol sub formă organică de microorganisme fixatoare de azot, atît libere, acţionînd în aerobioză sau în anaerobioză, cît şi simbionte cu plantele leguminoase şi unele neleguminoase. În etapele următoare — amonificarea şi nitrificarea — se realizează mineralizarea azotului astfel fixat în formă organică, precum şi a celui provenit din descompunerea cadavrelor şi a resturilor organice, asigurîndu-se pe această cale introducerea lui în circuitul biologic, graţie formei anorganice asimilabile pentru plante în care a fost adus. Un proces similar, cu particularităţi de detaliu impuse de natura deosebită a fiecărui mediu, se desfăşoară în permanenţă şi în apele dulci, în mări şi în oceane. O parte din azotul mineral asimilabil este pierdut din sol prin procesul de *denitrificare*.

b. Circuitul carbonului

Sursa cea mai importantă de carbon utilizabil în natură este atmosfera care conţine aproximativ 2,5 tone carbon sub formă de CO_2, deasupra unui hectar. Circuitul carbonului în natură începe cu procesul de fotosinteză clorofiliană

realizat de plantele verzi superioare şi inferioare, iar în ape de către fitoplancton şi de alte plante acvatice. Se apreciază că pe această cale plantele verzi pot fixa anual aproximativ $1{,}8.10^{11}$ tone carbon sub formă de CO_2. Substanţele de constituţie ale plantelor, formate prin fotosinteză, sînt folosite apoi ca hrană de animalele ierbivore şi omnivore şi, indirect, de cele carnivore.

În natură, cantităţi foarte mari de carbon sînt pierdute pentru ciclul biologic sub forma depozitelor de carbonaţi de Ca şi Mg insolubili din rocile calcaroase, sub formă de huilă, petrol, bitum etc. În acelaşi timp, se apreciază că şi în prezent, în oceane şi în mări, sînt sustrase din atmosferă circa 600 milioane tone CO_2/an prin activitatea biologică a vieţuitoarelor marine (plante şi animale), care fixează CO_2 sub formă de CO_3Ca, ce se depune pe fundul oceanelor. O parte din aceste pierderi sînt compensate prin întoarcerea în atmosferă a CO_2 rezultat din respiraţia animalelor (circa 5—10 milioane kg/CO_2/an), din respiraţia plantelor, din emanaţiile vulcanilor şi din arderi, dar aceste forme de recuperare nu ar putea compensa pierderile determinate de activitatea fotosintetizantă a plantelor terestre şi acvatice, ceea ce ar duce în cele din urmă la epuizarea CO_2 atmosferic şi la moartea tuturor organismelor vii. Acest fenomen dezastruos nu se întîmplă datorită faptului că în cea mai mare parte deficitul în CO_2 este contrabalansat de mineralizarea sub acţiunea microorganismelor a carbonului aflat în formă organică. Într-adevăr, după moartea organismelor, diferitele ţesuturi vegetale şi animale care au constituit substanţa vie, ca şi excretele animalelor, revin în sol şi în ape.

O parte din aceste forme de carbon depozitate suferă modificări chimice, care în anumite condiţii geologice le sustrag uneori pentru milioane şi sute de mili-

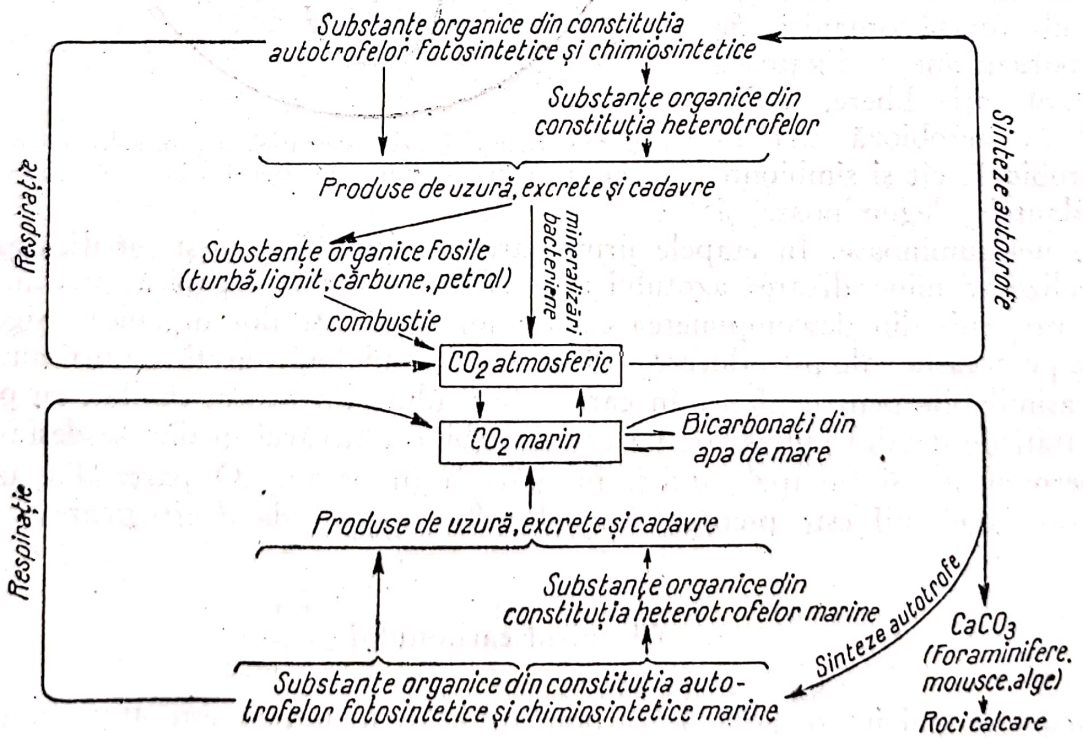


Fig. 436. Schema generală a circulaţiei carbonului în natură, incluzînd participarea microorganismelor (după Florkin).

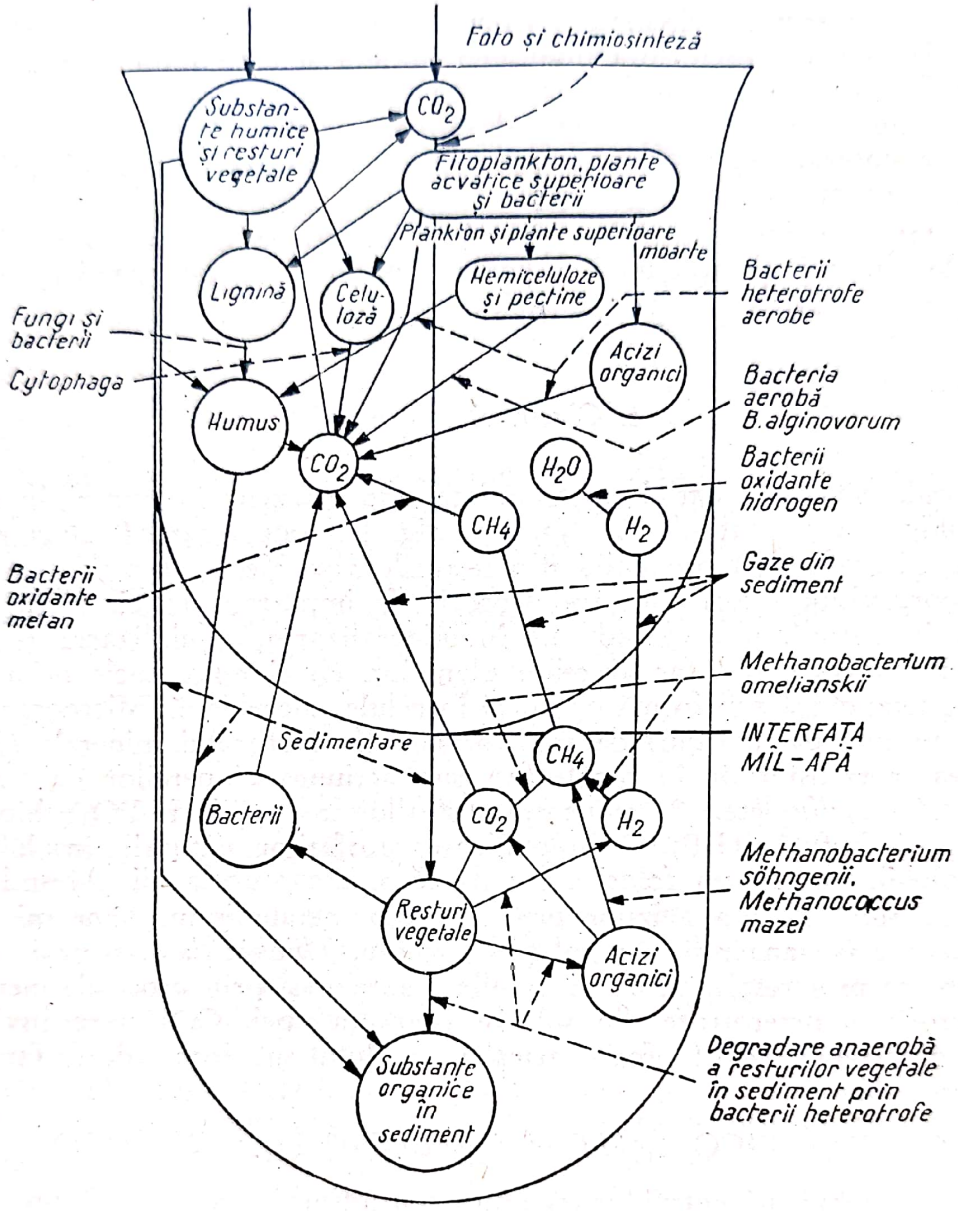


Fig. 437. Reprezentare schematică a proceselor microbiene implicate în circulația carbonului în lacuri (după Kuzneţov).

oane de ani circuitului biologic, sub formă de petrol şi cărbune (turbă, lignit, huilă, antracit etc.). Ele reintră în acest circuit, fie prin erupţii vulcanice, fie prin aducerea lor la suprafaţă prin extracţie minieră sau, în mod natural, prin fenomene geologice şi de combustie. Imensa majoritate a substanţelor organice sînt însă atacate imediat de microflora heterotrofă, descompunerea lor ducînd treptat pînă la o mineralizare mai mult sau mai puţin completă, cu o viteză variabilă după complexitatea moleculelor lor. Implicată în circuitul carbonului este cu deosebire degradarea microbiană în sol a unor hidrocarbonate ca celuloza, hemicelulozele, lignina, pectinele, cutina, chitina, amidonul, glucidele simple.

Privită în ansamblu, circulaţia carbonului, mai complicată decît aceea a N, este realizată de o microfloră mult mai variată şi mai puţin specializată. În plus, la fiecare etapă intermediară a acestui circuit, o parte din produse sînt preluate de alte microorganisme şi introduse în noi reacţii de sinteză. Între aceste reacţii de sinteză, cele mai importante duc la formarea humusului, principala substanţă nutritivă de rezervă din sol.

Activitatea microorganismelor intervine deopotrivă în transformările complexe ale compuşilor carbonului în bazinele naturale de apă, participînd direct la formarea marilor zăcăminte de ţiţei, cărbune şi petrol.

c. Circuitul fosforului

Fosforul, element esenţial pentru viaţă, este prezent în ape şi în sol sub formă *minerală* (fosfaţi de K, Na, Ca, Mg, Fe) sau *organică* (acizi nucleici, lecitine, glicerofosfaţi) provenită din resturile vegetale şi animale.

Microorganismele joacă un rol deosebit de important în circulaţia acestui element în natură, intervenind atît în mineralizarea, solubilizarea şi mobilizarea lui, proces care-l fac accesibil plantelor, cît şi fenomenele de asimilare şi fixare temporară sub formă organică în celula microbiană. Microorganismele din sol produc patru tipuri de transformări ale fosforului mineral: *1)* transformarea metafosfaţilor în ortofosfaţi sub acţiunea ciupercilor de tip *Penicillium, Aspergillus* etc.; *2)* reducerea fosfaţilor în fosfiţi (H_3PO_3), hipofosfiţi (H_3PO_2) şi fosfuri (H_3P); *3)* solubilizarea fosfaţilor naturali, insolubili sau puţin solubil, în vederea folosirii lor de către organismele vii. Acest lucru se realizează sub acţiunea acizilor proveniţi din metabolismul unor microorganisme aerobe sau anaerobe din sol (de exemplu, *Thiobacillus*), şi prin acţiunea CO_2, liberat prin respiraţie de rădăcinile plantelor şi prin procesele metabolice ale microflorei heterotrofe din sol. În prezenţa apei, CO_2 trece în H_2CO_3 care dizolvă particulele de fosfat tricalcic insolubil sub formă de fosfat monocalcic uşor solubil:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 4CO_2 + 4H_2O \rightarrow Ca(H_2PO_4)2 \cdot H_2O + 2Ca(HCO_3)_2$$

Fosfaţii solubilizaţi pot fi reprecipitaţi sau adsorbiţi pe coloizii din sol, dar în cea mai mare parte ei sînt asimilaţi de plantele superioare de la care trec la animale sub formă de combinaţii organice; *4)* utilizarea directă de către unele microorganisme *(Penicillium glaucum, Aspergillus niger)* a 1/3—1/5 din fosfatul tricalcic prezent în mediu, cu liberarea lui după moartea microorganismelor respective într-o formă asimilabilă pentru plante.

În cele din urmă, fosforul ajunge din nou în sol, însă în formă organică, o dată cu dejecţiunile animale sau cu ţesuturile vegetale şi animale moarte. Acestea suferă un proces de mineralizare la sfîrşitul căruia fosforul este adus din nou în circuitul biologic în formă utilizabilă de către plante, sub acţiunea unei microflore foarte variate, formată din bacterii din genul Bacillus *(B. megaterium* var. *phosphaticus, B. mesentericus, B. subtilis, B. asterosporus)*, din levuri *(Saccharomyces, Candida)* şi din ciuperci microscopice *(Penicillium, Aspergillus, Alter-*

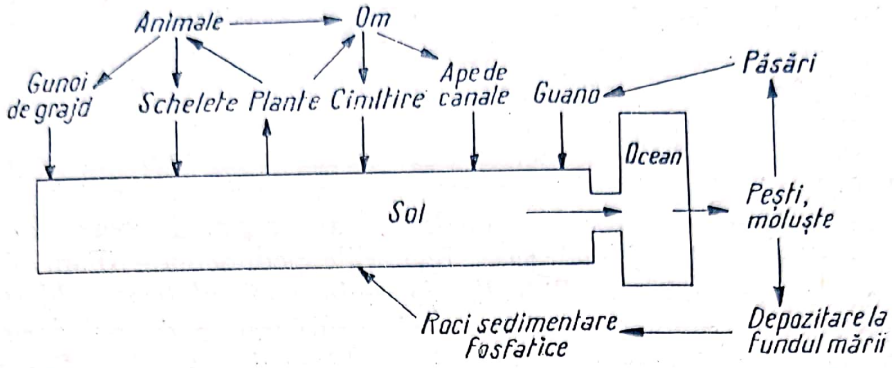


Fig. 438. Circulaţia fosforului în natură (după Lotka).

naria etc.). Din scindarea fosforului organic rezultă acid fosforic care este imediat legat de bazele din sol, trecînd în săruri de Ca, Mg, Fe, gréu solubile şi neutilizabile de către plante. Pentru a deveni utilizabili, aceşti fosfaţi suferă acţiunea bacteriilor nitrice, a thiobacteriilor şi chiar a unor amonificatori *(B. mycoides)*, care-i dizolvă cu formare de fosfat tricalcic, dicalcic şi monocalcic prin care se închide ciclul.

d. Circuitul fierului

Fierul este un element mineral absolut necesar vieţii, fiind — în cantităţi extrem de mici — indispensabil tuturor organismelor vii. În natură, el este prezent atît în *combinaţii organice*, provenite din ţesuturile organismelor superioare şi din celulele microorganismelor, cît şi sub formă de compuşi minerali, rezultaţi din descompunerea rocilor-mamă bogate în fier ca biotita, amfibolii şi piroxenii. Fierul mineral se găseşte sub formă solubilă, utilizabilă de organismele vii, sau insolubilă, deci inutilizabilă.

Microorganismele joacă un rol deosebit de important în circulaţia fierului în natură datorită capacităţii lor de a produce, după caz, trecerea lui în formă fie solubilă, fie insolubilă. În acest proces, fierul organic este mineralizat, pe cale microbiană, fie sub formă de Fe^{+++} (oxidat, cel mai adesea insolubil), fie de Fe^{++} (redus, cel mai adesea solubil). În afară de aceasta, Fe^{+++} mineral oxidat poate fi redus, iar cel redus, oxidat, tot prin procese microbiene. Circulaţia fierului în natură este asigurată de două tipuri de acţiuni microbiene: una *nespecifică*, realizată de o microfloră heterotrofă banală şi alta *specifică*, datorită unor microorganisme cu caracteristici biologice particulare.

Mineralizarea compuşilor organici ai fierului, avînd ca rezultat solubilizarea sau precipitarea lui în formă anorganică, este realizată de o microfloră heterotrofă nespecifică, foarte răspîndită în natură, şi anume de microorganismele proteolitice şi amonificatoare. Acţiunea acestei microflore este indirectă, realizîndu-se prin modificarea *p*H-ului, a potenţialului de oxido-reducere al solului şi al apelor, sau prin acumularea de acizi organici şi este mult mai importantă decît aceea a bacteriilor cu acţiune specifică.

Transformările microbiene ale compuşilor minerali ai Fe sînt realizate de microorganisme specifice care au ca habitat apele, apărînd numai temporar şi accidental în sol. Bacteriile din Fam. *Chlamidobacteriaceae* (*Sphaerotilus natans, Leptothrix ochracea, Crenothrix polispora* etc.) formează filamente lungi de cîteva sute de μ acoperite de o teacă mucilaginoasă impregnată cu hidroxid feric şi hidroxid de mangan. Acumularea lor produce un depozit noroios, ca un strat de rugină murdară, care acoperă rocile sau formează depozite în albia apelor feruginoase. Bacteriile pedunculate (Fam. *Caulobacteriaceae*) ca, de exemplu, *Gallionella ferruginea, Caulobacter blastocaulis,* se fixează pe diferite suporturi solide cu ajutorul unui pedunculul format dintr-o substanţă gumoasă, impregnată uneori cu hidroxid de fier. Ele pot forma agregate care astupă conductele de apă potabile. În sfîrşit, bacterii anaerobe ca *Sporovibrio ferrooxidans* oxidează Fe^{++} la Fe^{+++} în prezenţa nitraţilor, iar bacterii facultativ-anaerobe ca *B. circulans, B. polimyxa, Aerobacter* sp. ş.a. reduc Fe^{+++} la Fe^{++}.

e. Circuitul sulfului

Sulful există în natură fie sub formă organică, în compoziţia unor aminoacizi ca cisteina, cistina şi metionina — deci în structura proteinelor vegetale şi animale — şi în unele vitamine ca tiamina şi biotina, fie sub formă anorganică de sulf elementar, H_2S, sulfuri, tiosulfaţi, tetrationaţi şi sulfaţi. Aceşti compuşi cu sulf îşi au originea, în cea mai mare parte, în resturile animale, vegetale şi microbiene, ca şi în activitatea biologică a unor microorganisme. În atmosferă se găsesc H_2S, SO_2 şi alţi compuşi ai sulfului, provenind din erupţii vulcanice, arderi şi degajare din sol (evaporarea apelor sulfuroase, descompunerea substanţelor organice etc.), care sînt permanent readuşi în sol sub acţiunea apelor de ploaie. În plus, sulful mai este prezent, în natură, în mine şi în alte depozite — ca sulf mineral pur — şi sub forma a diferiţi compuşi ca H_2S, sulf coloidal şi oxizi de sulf, în apele minerale sulfuroase.

Element absolut necesar pentru formarea constituenţilor celulari, sulful, ca şi azotul, suferă în natură o serie de transformări ciclice care-l aduc, în cantităţi convenabile, în formele accesibile organismelor vii. Mineralizarea sulfului organic, acumulat în sol o dată cu dejecţiile organismelor animale şi, mai ales, cu ţesuturile animale şi vegetale moarte — sulf inaccesibil ca atare plantelor superioare — se realizează prin acţiunea de degradare exercitată de microflora nespecializată de putrefacţie (*Proteus* sp., *Cl. sporogenes, Cl. putrificum* etc.). Produşii finali majori ai acestei degradări sînt H_2S în anaerobioză, şi H_2S, mercaptanii şi diferiţi compuşi minerali parţial sau complet oxidaţi cum este $SC_4^{=}$, în aerobioză. Cea mai mare parte dintre produşii procesului de mineralizare a sulfului (sulfaţi, sulfiţi, tiosulfiţi, H_2S, S) pot fi folosiţi de microorganisme pentru propriile lor necesităţi fiziologice. Metabolizarea microbiană a sulfului comportă atît reacţii de reducere a compuşilor lui oxidaţi, cît şi procese de oxidare a formelor reduse ale acestui element.

Reducerea formelor oxidate ale sulfului: sulfaţi ($SO_4^{=}$), sulfiţi ($SO_3^{=}$), tiosulfiţi ($S_2O_3^{=}$) este efectuată de microorganisme prin două feluri de procese meta-

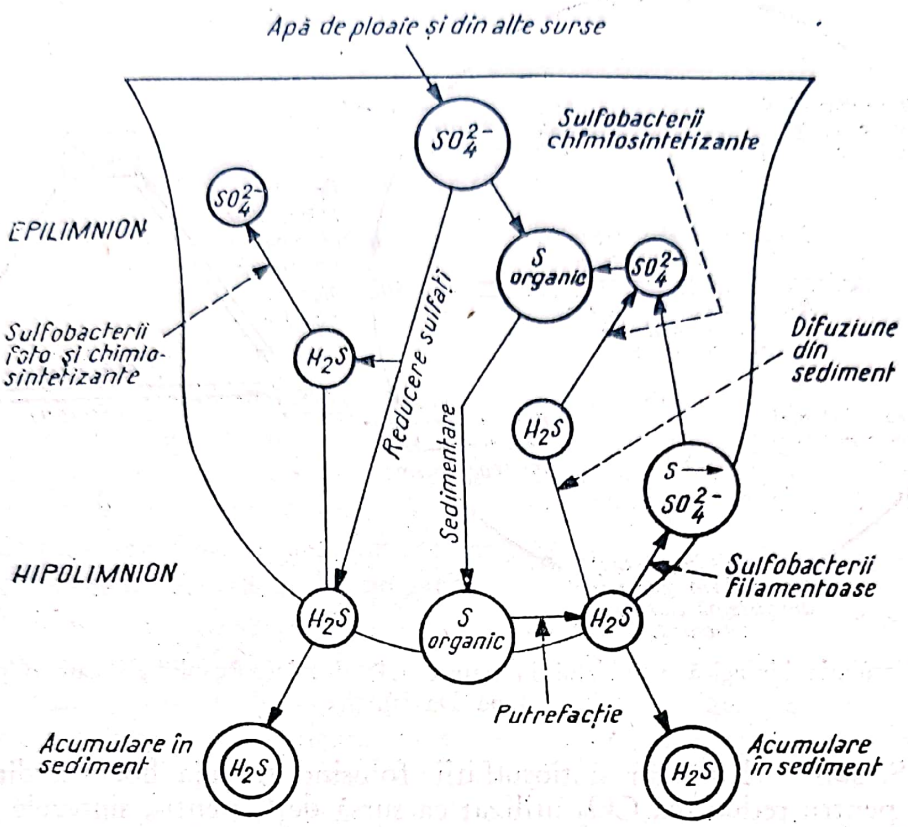


Fig. 439. Reprezentare schematică a proceselor microbiene implicate în circulația sulfului în lacuri (după Kuznețov).

bolice: *a*) reducere asimilatorie, prin care sulfații sînt folosiți ca unică sursă de sulf de către unele microorganisme nespecializate (*Proteus vulgaris, E. coli, Pseudomonas* sp., *Nitrobacteriaceae*), care-l incorporează în diferite substanțe organice, cu eliberarea numai a unor mici cantități de H_2S; *b*) reducerea dezasimilatorie, prin care microorganisme specializate din genul *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*) utilizează sulfații ca acceptori finali de electroni în procesul de respirație anaerobă, cu producerea unor cantități mari de H_2S. Reducerea anaerobă a formelor oxidate ale sulfului se realizează în special în solurile umede saturate cu apă, în turbării, unde H_2S format pe această cale reacționează cu fierul dînd sulfura de fier care dă solurilor o culoare negricioasă caracteristică.

Oxidarea sulfului poate fi efectuată atît asupra formelor sale reduse ca H_2S și sulf elementar, cît și asupra unor compuși numai parțial oxidați, ca sulfații și tiosulfații. Bacteriile sulfooxidante fotosintetizante (*Chromatium okenii, Thiocystis, Thiocapsa, Rhodocapsa, Chlorobium* etc.) oxidează H_2S în prezența luminii pînă la S elementar pe care-l depun în celulă sub formă de granule. Cînd cantitatea de H_2S din mediu scade sau se epuizează, aceste bacterii oxidează sulful intracelular la $SO_4^{=}$. O altă modalitate de oxidare a formelor reduse ale sulfului este proprie bacteriilor sulfooxidante chemosintetizante (*Thiobacillus* sp., *Thiospirillum* sp., *Thiococcus*), foarte răspîndite în natură, care oxi-

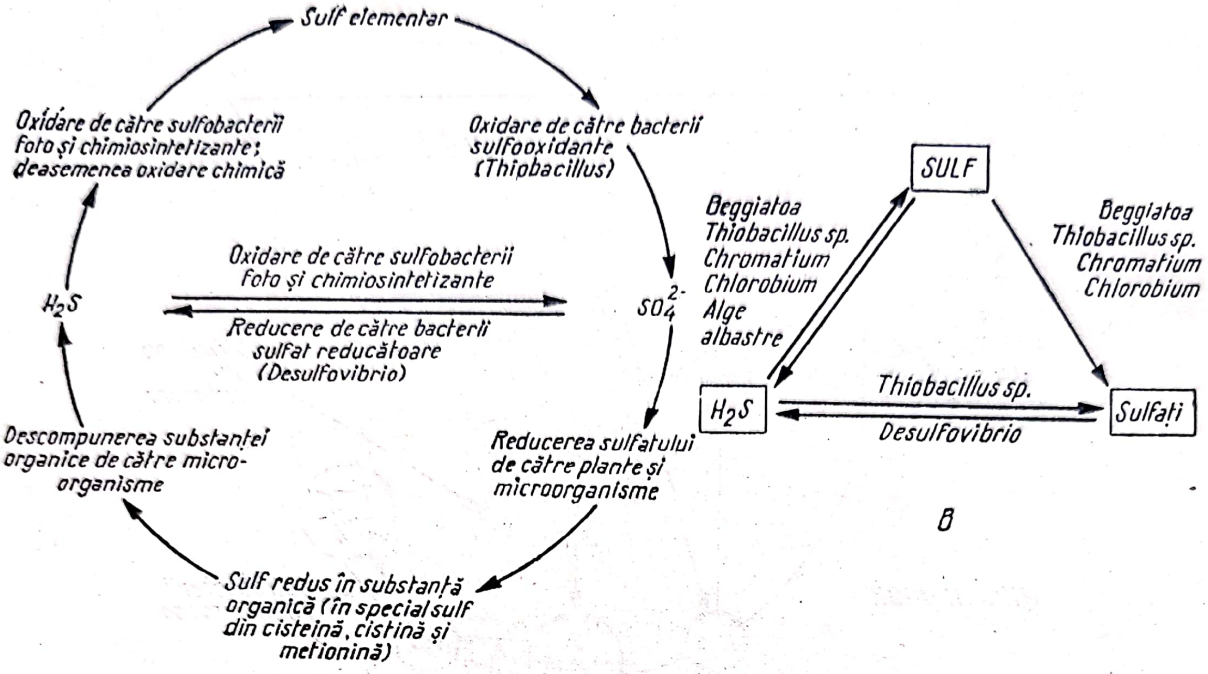


Fig. 440. Circulația biologică a sulfului în natură (*A*) și microorganismele care o produc (*B*) (după Davis).

dează H_2S, sulful elementar și tiosulfații, folosind energia liberată din reacția oxidativă pentru reducerea CO_2 utilizat ca sursă de C pentru sintezele lor celulare. De exemplu, la *Thiobacillus thioparus* procesul decurge după reacția: $5\,Na_2S_2O_3 + H_2O + 4\,O_2 \rightarrow 5\,Na_2SO_4 + H_2SO_4 + 4\,S$. De astă dată, sulful elementar nu mai este depus în celulă, ci excretat în mediu, unde formează depozite sedimentare de sulf. De cele mai multe ori însă el este oxidat la H_2SO_4, care se combină cu carbonații pentru a forma sulfați, singura formă în care acest element este utilizabil de către plantele verzi:

$$4\,S + 6\,O_2 + 4\,H_2O \rightarrow 4\,H_2SO_4$$

$$3\,H_2SO_4 + Ca_3(PO_4)_2 + 2\,H_2O \rightarrow 3\,CaSO_4 \cdot 2\,H_2O + 3\,H_3PO_4.$$

În concluzie, în circulația S în natură, microorganismele au un rol esențial prin acțiunea lor de mineralizare a sulfului organic, neasimilabil ca atare, și de reintroducere a formei lui anorganice în circuitul elementelor biogene în natură. Această reducere a sulfului în formă organică este realizată de microorganisme fie direct, prin încorporarea lui în propria lor celulă pe calea reducerii asimilatoare a sulfaților, fie indirect prin transformarea sulfului mineral în sulfați, singura formă în care acest element este asimilabil de către plantele verzi.

O trecere în revistă succintă a proceselor microbiene implicate în circulația materiei în natură arată că dacă plantele verzi îndeplinesc un rol cosmic, prin faptul că au capacitatea de a sintetiza substanțe organice cu ajutorul energiei solare, microorganismele sînt cele care asigură posibilitatea dezvoltării plantelor verzi, deoarece prin activitatea lor metabolică ele condiționează circuitul elementelor biogene între formele organice și anorganice ale materiei.

ELEMENTE DE MICROBIOLOGIE MARINĂ

Microbiologia marină studiază microorganismele din mediul marin şi rolul lor în transformarea substanţelor din acest mediu în circuitul elementelor biogene, în asigurarea productivităţii biologice a mării, în fenomenele geologice submarine (formarea rocilor biogene şi a unor minereuri), ca şi în diferite procese dăunătoare (bolile peştilor, acţiunea corosivă asupra ambarcaţiunilor, a instalaţiilor metalice sau de beton etc.).

Mediul mari oferă organismelor care-l populează condiţii de viaţă speciale, determinate de suprafaţa şi volumul său imens [1], conţinutul mic în substanţe organice, gradul ridicat de salinitate, precum şi de oxigenare slabă, temperatura scăzută şi presiunea ridicată caracteristice marilor adîncimi. Ca urmare, populaţia sa microbiană prezintă unele particularităţi specifice care justifică luarea ei în considerare, în genere, ca un grup ecologic separat.

Acest mediu acvatic cu unele caracteristici dominante de ordin general nu este totuşi perfect uniform sub raportul condiţiilor ecologice. W o o d deosebeşte, din acest punct de vedere, trei tipuri de habitat marin: 1) **mediul oceanic,** relativ constant şi uniform în raport cu solul, apele dulci şi estuarele, întrucît prezintă numai diferenţe de temperatură şi salinitate între zonele arctice şi cele ecuatoriale şi deosebiri de presiune între suprafaţă şi adînc; 2) **mediul estuarin,** care constituie o zonă de tranziţie topografică, fizico-chimică şi biologică între apele dulci şi sol, pe de o parte, şi mare, pe de altă parte; 3) **sedimentul,** reprezentat de zona de fund care, deşi în contact cu apa oceanică şi format din materiale derivate parţial din ea, formează totuşi o biocenoză aparte. Distribuţia şi compoziţia calitativă a micropopulaţiei se supun zonării impuse de această diferenţiere a mediului oceanic şi marin.

Ca şi microflora solului, microflora marină totală este formată din: *1) microflora permanentă* — adaptată la condiţiile specifice ale mediului marin — întîlnită în profunzimi şi la depărtare de ţărm; *2) microflora temporară* — reprezentată de contaminanţi care supravieţuiesc puţin, proveniţi din sol, apele dulci şi canale (în zonele de litoral şi în estuare) sau din ambarcaţiuni şi

---

[1] Aproximativ 72% din suprafaţa globului este acoperită de apă şi din aceasta, peste 98% este reprezentată de mări şi oceane (Z o B e l l, 1963) al căror volum total este apreciat la circa 1 330 000 km³ (B e r g e t).

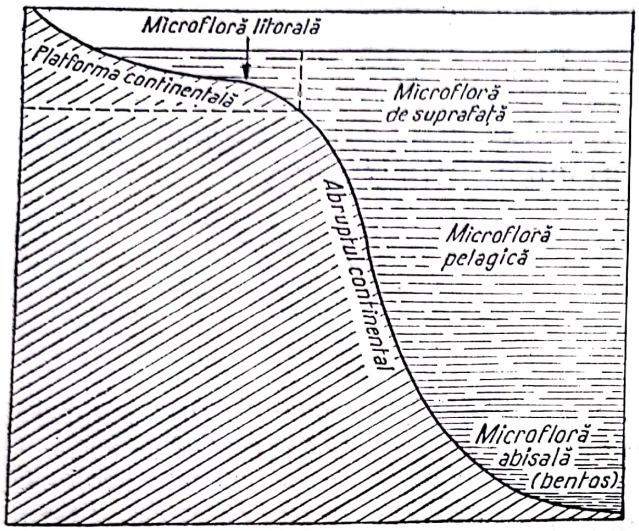


Fig. 441. Distribuţia zonală a microflorei în mediul marin.

3) *microflora ubiquitară*, constînd din specii comune solului şi mărilor (de exemplu, bacteria *Welchia perfringens*).

Ca repartiţie pe orizontală, în zonele de litoral şi în estuare, microflora este formată dintr-un amestec de specii terestre şi marine, pentru ca, paralel cu depărtarea de ţărm, caracterul ei specific să se stabilizeze, atît la suprafaţă, cît şi în profunzime, în sensul ocupării progresive a mediului de către microflora marină permanentă.

Pe verticală, microflora marină poate fi grupată în trei categorii: *a*) *microflora de suprafaţă*, care coboară numai pînă la cîţiva metri în adîncime, liberă sau asociată cu plantele şi supusă la variaţii cantitative şi calitative după capriciile curenţilor marini; *b*) *microflora pelagică*, trăind între suprafaţă şi fund, uneori redusă numeric şi dependentă de prezenţa substanţelor organice şi de acţiunea curenţilor; *c*) *microflora bentonică*, din fundul mărilor şi oceanelor, mult mai stabilă ca număr şi compoziţie, fiind mai puţin expusă factorilor capabili să producă variaţii în componenţa ei.

1. CARACTERISTICILE GENERALE ALE MICROFLOREI MARINE

Spre deosebire de extraordinara bogăţie în specii a florei şi faunei marine, micropopulaţia mediului marin, reprezentată de virusuri (fagi), bacterii, actinomicete (*Nocardia* şi *Streptomyces*), fungi şi protozoare este calitativ săracă. Această particularitate este în discordanţă şi cu caracterul foarte diversificat al micropopulaţiei solului.

Bacteriile, care joacă rolul biologic cel mai important, sînt reprezentate în microflora marină în special de specii Gram-negative (95% faţă de circa 30% în sol), aparţinînd genurilor *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Spirillum*, *Micrococcus*, *Sarcina*. Marea majoritate a speciilor sînt mobile şi aerobe, facultativ anaerobe (aerobele şi anaerobele stricte sînt rare în acest mediu). Aproximativ 60—70% dintre specii sînt cromogene, elaborînd pigmenţi galbeni (31,3%), portocalii (15,2%), bruni (9,9%), verzi fluorescenţi (7,4%), roşii (5,4%) sau verzi (0,2%). (Z o B e l l şi F e l t h a m). În general, bacteriile marine sînt nesporulate. Multiplicarea lor este mai lentă decît aceea a bacteriilor adaptate la mediul terestru şi are loc în condiţii optime la 15—18°C pentru majoritatea speciilor, iar pentru cele abisale chiar la 0°.

Din grupurile fiziologice principale, în mări şi oceane se găsesc numeroase bacterii capabile de fotosinteză (*Thiorhodaceae, Athiorhodaceae, Chlorobacteriaceae*), celulozolitice (*Cytophaga* sp.), fixatoare de N_2 (*Azotobacter, Clostridium*), amonificatoare, nitrificatoare, denitrificatoare, sulfooxidante şi sulfat-reducătoare, ferobacterii, bacterii chitinolitice etc. În sfîrşit, microflora marină mai conţine microorganisme patogene pentru plantele şi animalele marine. Printre speciile patogene pentru animale se numără, de exemplu, bacteriile *Aeromonas salmonicida* (furunculoza peştilor), *Haemophilus piscium* (ulceraţii ale peştilor), *Pseudomonas* sp. (care produc diferite infecţii) şi unele virusuri care produc boli netumorale ale peştilor. Bacteriile chitinolitice (*Bact. chitinolyticum, Bact. chitinochroma etc.*), care elaborează o chitinază capabilă să descompună chitina, pot determina şi îmbolnăviri în masă ale crustaceelor mari, prin liza carapacei de înveliş.

Levurile (*Rhodotorula, Torulopsis, Hanseniospora* etc.) sînt mai numeroase (sute-mii/l), mai ales în apropierea ţărmului, în zonele de suprafaţă şi în special lîngă iarba-de-mare şi păturile de alge. Deşi prezenţa lor în apa mării ar fi tranzitorie (W o o d), ele sînt importante pentru echilibrul biologic în acest mediu, deoarece descompun substanţele organice şi sînt implicate în circuitul elementelor biogene, fie direct, fie prin folosirea lor ca hrană de către animalele marine, în care caz contribuie şi la determinarea productivităţii biologice marine.

Mucegaiurile din mări ar forma, după unii autori (M o o r e şi M y e r s), un grup aparte (*Thalassomycetes*), format din specii saprofite, aerobe, halofile, asociate cu planctonul, cu algele şi cu organismele animale. Ele participă la procesele de transformare a substanţelor organice din oceane şi din sediment. Unele mucegaiuri (*Achyla, Saprolegnia*) sînt parazite ale animalelor marine.

2. DENSITATEA MICROFLOREI MARINE ŞI FACTORII CARE O INFLUENŢEAZĂ

Bacteriile populează întreaga masă de apă a mărilor şi oceanelor, fiind însă răspîndite neuniform, în funcţie de intervenţia unui număr de factori fizici, chimici şi biologici.

Microorganismele marine sînt asociate cu plantele şi animalele în zona cuprinsă între suprafaţă şi adîncimea de 200—400 m (zona *eufotică*), în care pătrund razele de lumină şi unde fotosinteza este posibilă. În zona *afotică*, obscură, situată sub 400 m, plantele verzi dispar şi microorganismele rămîn asociate numai cu animalele.

Densitatea populaţiei microbiene este mai mare în apropierea coastelor — în special lîngă cele locuite — unde poate ajunge de la 500 mii pînă la cîteva milioane de germeni/ml, pentru ca să scadă treptat spre larg, unde reprezintă numai cîteva zeci pînă la 250 celule/ml. În ceea ce priveşte variaţiile cantitative ale florei microbiene în raport cu adîncimea, numărul de bacterii scade în general de la suprafaţă spre adînc. Densitatea populaţiei bacteriene din mări pare să fie în general maximă la adîncimi cuprinse între 25 şi 50 m,

scăzînd paralel cu creşterea adîncimii, pentru ca sub 500 m să fie foarte mică, iar dincolo de 1 000 m să fie uneori nedecelabilă într-o probă mică de apă (25—30 ml). Numărul bacteriilor creşte din nou pe fundul mărilor şi oceanelor, unde poate ajunge să fie în medie de 10^2—10^5 celule/g mîl.

Populaţia bacteriană este mai densă pe fundurile mai puţin adînci, unde depozitul de substanţe organice vegetale şi mai ales animale provenit din sedimentare este mai mare, ceea ce favorizează nutriţia microorganismelor. În Marea Neagră, la adîncimea de 41—300 m, numărul bacteriilor variază între 350 şi 493 milioane g/mîl. În general, valorile maxime de biomasă bacteriană se întîlnesc în mări şi oceane sub zona maximă a masei de fitoplancton şi totdeauna în limitele zonei eufotice, unde se face fotosinteza, sau pe fundurile puţin adînci, bogate în substanţe organice. Biomasa bacteriană în zonele în care numărul bacteriilor este de 10^5/ml depăşeşte 20,0 mg/m^3 apă, ceea ce reprezintă o producţie anuală de 730 mg carbon/m^3/an. S-a descris şi o fluctuaţie verticală zilnică a bacteriilor şi a fitoplanctonului, acestea lăsîndu-se la fund noaptea, pentru a se ridica din nou spre suprafaţă la lumina zilei.

Densitatea microflorei marine este influenţată — în măsură mai mică sau mai mare — de unii factori fizici ca razele UV şi presiunea hidrostatică şi, mai ales, de factorii biotici. Acţiunea razelor ultraviolete asupra densităţii microflorei marine este foarte slabă, deoarece fracţiunea lor bactericidă este complet oprită după traversarea a cîţiva centimetri de apă. Presiunea hidrostatică în mări şi oceane creşte cu aproximativ 1 atm pentru fiecare 10 m. Ca urmare, în fundul mărilor, la o adîncime de 10 000 m, ea poate să ajungă la 1 000 atm. Presiunea mărită nu reduce densitatea microflorei, dovadă fiind faptul că în mîlul recoltat de la 7 000 m adîncime s-au găsit în unele cazuri pînă la 1 milion de bacterii/g. Ea exercită însă o acţiune selectivă sub raportul distribuţiei speciilor, în aşa fel încît în zonele abisale speciile banale dispar, lăsînd locul celor barofile şi criofile.

În ceea ce priveşte dependenţa lor de factorii biotici, bacteriile se găsesc în mări, ca şi pretutindeni, acolo unde există organisme vii şi substanţă organică provenită din ţesuturile vegetalelor şi animalelor moarte. Waksman arată că există un paralelism strîns între conţinutul apei de mare în bacterii şi bogăţia ei în placton, cea mai mare parte dintre bacterii fiind fixate pe planctonul viu sau mort. În felul acesta, viaţa în mări şi oceane apare ca o vastă simbioză sau metabioză, în care microflora, fauna şi flora sînt în relaţii de interdependenţă.

Aşadar, mediul marin, ca şi solul, este un mediu „viu", complex, puţin stabil la suprafaţă sau la ţărm, dar mai constant începînd de la o oarecare adîncime sau depărtare de coastă, în care abundenţa microorganismelor este în funcţie de prezenţa substanţelor organice în suspensie şi de intensitatea cu care se manifestă viaţa plantelor şi animalelor. Acolo unde viaţa vegetală şi animală se desfăşoară intens, populaţia microbiană este foarte densă şi bogată în specii, indiferent de condiţiile de mediu (insolaţie, temperatură, presiune, distanţă de coastă etc.), în timp ce în zonele de „acalmie biologică" populaţia microbiană se reduce la cîteva specii, cu număr mic de indivizi din cauza

lipsei de hrană. În funcţie de aceşti factori, microflora marină atinge densitatea sa maximă în apropierea ţărmurilor şi a fundului, în mările puţin adînci şi în cele foarte populate de alte vieţuitoare.

3. IMPORTANŢA ACTIVITĂŢII MICROORGANISMELOR DIN MĂRI ŞI OCEANE

Microorganismele din mări şi oceane au în primul rînd un rol important în asigurarea producţiei şi productivităţii [1] biologice a mărilor şi oceanelor.

Bacteriile exercită în mări şi oceane, ca şi în sol, o acţiune de mineralizare a substanţelor organice provenite din resturi vegetale şi animale, furnizînd în felul acesta plantelor acvatice elementele biogene esenţiale vieţii. La rîndul lor, plantele devin apoi hrană pentru animale. Deşi în mări se introduc permanent cantităţi mari de substanţă organică provenind din fotosinteza efectuată de plantele marine şi din sol, conţinutul în material organic al apei de mare este foarte mic (rareori peste 5 mg/l). Aproximativ 60% din substanţa organică este mineralizată, iar restul este transformată în substanţă celulară bacteriană (Waksman).

Microorganismele marine au şi o activitate geologică permanentă, contribuind la formarea sedimentelor marine sulfuroase, a celor de fier, a zăcămintelor de petrol etc. Pe de altă parte, bacteriile sînt folosite ca hrană de numeroase animale marine (protozoare, metazoare mici şi, probabil, chiar mai mari), unele dintre acestea fiind, la rîndul lor, utilizate ca hrană de alte animale, în speţă de peşti. Faptul că peştii flămînzi au intestinul steril sugerează că bacteriile ingerate o dată cu hrana au fost ele însele digerate. În plus, enzimele bacteriene din tubul digestiv al animalelor marine catalizează hidroliza celulozei, a chitinei şi altor substanţe complexe ingerate de aceste organisme. În zonele estuarine şi în apa de deasupra mîlului, numărul bacteriilor este atît de mare încît ele furnizează aproximativ 0,1 ml masă celulară/l apă. Ţinînd seamă de faptul că o stridie filtrează zilnic circa 2 l apă, înseamnă că ea poate obţine astfel aproximativ 2 ml hrană bacteriană (tab. 30).

Microflora marină exercită şi unele acţiuni dăunătoare. În afară de influenţa nocivă directă a bacteriilor patogene asupra animalelor marine şi în special asupra peştilor, microorganismele prezente pe suprafaţa corpului, pe branhiile şi chiar în intestinul peştilor pot produce pagube datorită alterării acestora înainte de folosire sau conservare. Bacteriile marine chitinolitice exercită prin intermediul chitinazei lor o acţiune complexă: *a*) degradează în apă şi în mîl cantităţi mari de chitină provenită din resturile organismelor animale, cu formare de CO_2, NH_3, acid acetic şi zaharuri reducătoare; *b*) digeră în intestinul animalelor marine chitina ingerată de acestea; *c*) atacă (*B. chitinolyticum*) crustaceele mari (de exemplu, homarul), producîndu-le boli grave prin liza

[1] După Wood, *„producţia"* biologică reprezentă cantitatea de material (apreciată în funcţie de biomasă) produs în unitatea de timp, iar *„productivitatea"*, capacitatea de a produce energie potenţială şi de a o transforma ulterior (se apreciază în funcţie de energia produsă pe unitatea de timp şi de volum).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 30

VALOAREA BIOMASEI BACTERIENE ŞI A PRODUCŢIEI DE CARBON ÎN APA MĂRII ÎN RAPORT CU DIFERITE DENSITĂŢI ALE POPULAŢIEI BACTERIENE *)
(după Z o B e l l)

Bacterii/ml	Biomasă bacteriană pe m³ apă		Mg carbon producţie anuală pe m³
	Mg greutate umedă	Mg carbon	
10	0,002	0,0002	0,073
10^2	0,02	0,002	0,73
10^3	0,2	0,02	7,3
10^4	2,0	0,2	73,0
10^5	20,0	2	730,0

[1] Calculat pentru bacterii care se divid odată la 24 de ore.

carapacei lor chitinoase. De asemenea, prin acţiunea lor corosivă asupra metalelor, microorganismele contribuie la degradarea şi bioblocarea conductelor, a instalaţiilor portuare şi a ambarcaţiunilor. În plus, după cum a stabilit K a l i m e n k o, bacteriile participă la formarea depozitelor de pe partea submersă a vapoarelor şi a altor ambarcaţiuni. Depunîndu-se pe suprafeţele metalice în contact permanent cu apa, bacteriile formează pe ele un strat de înveliş, sub forma unei membrane albumino-mucilaginoase care favorizează depunerile de calcar şi fier. Pe un asemenea depozit se fixează ulterior diverse plante şi animale, constituind o epibioză cu rol important în micşorarea vitezei vapoarelor.

4. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA NĂMOLURILOR TERAPEUTICE

Nămolul este o materie neagră, plastică, onctuoasă, care se găseşte pe fundul lacurilor şi mărilor şi care a luat naştere în urma unor transformări geologice şi biochimice desfăşurate de-a lungul tuturor epocilor geologice posterioare apariţiei vieţii pe Pămînt. El s-a format sub acţiunea microorganismelor, pe de o parte din substanţele organice şi anorganice ale solului local, iar pe de altă parte, din resturile faunei şi florei lacustre. O dată formate, nămolurile suferă în continuare acţiunea microorganismelor din ele (în număr pînă la 1—3 miliarde de celule/gram), care le descompun, modifică şi sintetizează constituenţii, transformîndu-le în nămoluri negre, bine dispersate, cu rol terapeutic.

Sub acţiunea succesivă sau simultană şi asociată a diferitelor grupe fiziologice de microorganisme (cu reprezentanţi dintre bacterii, actinomicete şi ciuperci), resturile organice provenite din plancton, bentos şi macrofite sînt mineralizate şi transformate într-o masă amorfă, coloidală numită *sapropel* („nămol care putrezeşte"), care se depune la fundul apei. Activitatea biochimică maximă are loc în stratul superficial al sedimentului, considerat ca strat generator de

nămol (pelogen). Acest strat este gros de circa 50 cm în lacurile eutrofe, bogate în substanţe organice, şi de numai 10—20 cm în cele distrofe. Creşterea lui anuală variază între 6, 7 şi 25 mm. În stratul pelogen se continuă în special descompunerea substanţelor organice greu atacabile (celuloza, complexele ligninohumice etc.), care sînt atacate mai ales de ciuperci (*Fusarium, Saprolegnia, Alternaria, Aspergillus, Penicillium* etc.). Cu timpul, straturile profunde se tasează, se mineralizează şi, ca urmare, conţinutul lor în substanţe organice scade. Viaţa continuă totuşi în aceste straturi pînă la mari adîncimi, graţie unei microflore limitate numeric şi puţin variate ca specii.

Microorganismele îmbogăţesc nămolul nu numai prin transformarea şi mineralizarea substanţelor organice, ci şi prin produsele activităţii lor vitale (vitamine, auxine, substanţe antibiotice). În plus, ele dau nămolului plasticitate şi influenţează gradul lui de hidratare şi dispersie moleculară, graţie speciilor care produc substanţe mucoase ca zoogleea bacteriilor sulfuroase. În felul acesta, fundul unui lac reprezintă un adevărat laborator natural în care resturile vegetale şi animale sînt transformate în nămol de către microorganisme. Procesul de formare a nămolurilor continuă şi astăzi. Astfel, în Lacul Negru de la Sovata, se depun anual aproximativ 64 tone de nămol, din care prin presiune şi tasare numai 1 : 10 devine nămol terapeutic.

Nămolurile terapeutice sînt folosite empiric din antichitate, iar rolul microorganismelor în formarea lor a fost bănuit încă din 1897 (Voronin). Modul lor de acţiune asupra organismului uman nu este însă bine cunoscut nici în prezent. Din unele nămoluri (Techirghiol) s-au izolat microorganisme cu acţiune puternic antagonistă, dar s-a pus în evidenţă şi un efect antibacterian neselectiv. Studiul genezei depunerilor sapropelice prezintă un deosebit interes deoarece ele sînt rezultatul unuia dintre procesele prin care se formează în prezent combustibili fosili.

Scanned with OKEN Scanner

Activitatea geologică a microorganismelor. Microorganismele reprezintă unul din factorii importanţi ai istoriei Pămîntului. Deşi în mod curent se consideră că, neavînd un schelet sau părţi tari ale corpului, bacteriile nu se pot fosiliza, există totuşi urme ale existenţei lor în epocile geologice îndepărtate, constînd din amprente rămase, ca şi cele ale plantelor superioare, în cele mai vechi straturi ale Pămîntului. Astfel, Cayeux a găsit asemenea „fosile" bacteriene în rocile sedimentare, formate începînd din Precambrian, deci eşalonate ca vechime aproape de la un capăt la altul al erelor geologice. Aceste fosile corespund unor organisme în formă de sferule de 0,5—2,5 microni, delimitate de un înveliş gros şi dispune izolat sau în şiruri ori în grămezi neregulate. La examenul microscopic al unei suprafeţe de 150 mm^2 s-au putut număra cîteva sute de astfel de formaţii. Ulterior, Bradley (1963) a descoperit fosile de *Micrococcus* sp. în straturi din Cretacicul inferior (timpuriu) şi de *Escherichia* sp. în coproliţi din depozite eocenice. Ehlers (1965) a descris fosile de bacterii feruginoase, *Sphaerotilus* şi *Gallionella* sp., observate cu ajutorul microscopiei electronice în piritele din Carboniferul superior.

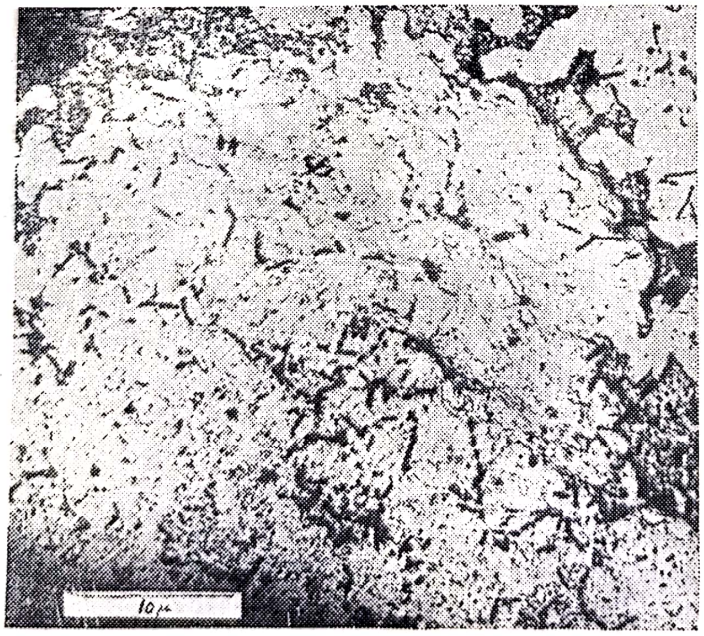


Fig. 442. Celule bacteriene fosilizate în pirite, evidenţiate prin microelectronografie (după Ehlers).

Ţinînd seama de faptul că tipurile morfologice întîlnite la fosilele bacteriene sînt asemănătoare acelora ale bacteriilor actuale, s-a pus problema dacă nu ar fi vorba de o contaminare ulterioară a straturilor geologice respective şi nu de o supravieţuire a grupului bacteriilor un timp atît de îndelungat. În general, se poate considera că numărul mare de fosile bacteriene din rocile sedimentare amintite exclude posibilitatea unei contaminări

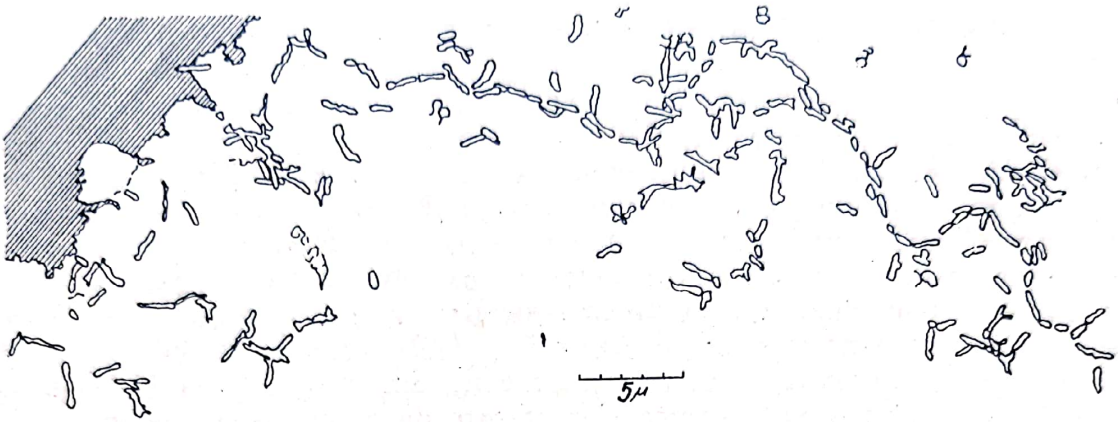


Fig. 443. Reprezentare schematică a unui lanţ de celule bacteriene fosilizate în pirite evidenţiate prin microelectronografie (după Ehlers).

recente, iar pe de altă parte, o dăinuire timp de lungi perioade geologice este posibilă pentru un grup de organisme atît de adaptabile, mai ales că aceasta n-ar reprezenta un fenomen fără precedent în biologie (se cunosc specii preistorice de plante şi animale care s-au menţinut pînă în epocile moderne). În sfîrşit, din roci saline vechi de circa 180 şi 650 milioane de ani, situate la o adîncime de 400 m, Dombrowski (1962), a izolat bacterii din specia *Bacillus circulans* nefosilizate, mumificate şi chiar bine conservate, deci capabile să-şi reia în anumite condiţii activităţile vitale. Bacteriile izolate nu puteau utiliza hidrocarbonatele care intră obişnuit în compoziţia mediilor de cultură, fapt care sugerează că substanţe de acest tip nu existau în epoci geologice atît de îndepărtate. Supravieţuirea lor a fost posibilă graţie stratului foarte gros de rocă salină care le-a acoperit, apărîndu-le de acţiunea razelor cosmice, şi s-a realizat probabil nu prin încetinirea activităţilor vitale, ci printr-o adevărată suspendare a oricărui proces fizico-chimic şi biologic (anabioză).

În ceea ce priveşte activitatea bacteriilor din epocile geologice îndepărtate, aceasta nu poate fi apreciată, decît în raport cu caracteristicile ei actuale. Activitatea geochimică a bacteriilor în mări şi în oceane se desfăşoară în microareale, independent de dimensiunile întregii mări. În trecut, această activitate era probabil mai intensă la ţărmurile mărilor şi ale oceanelor şi în zonele cu apă mai puţină (golfuri şi lagune), unde se acumulează cea mai mare cantitate de substanţă organică după moartea florei şi a faunei marine. În aceste condiţii, în jurul unor acumulări bacteriene de tipul coloniilor, s-au putut petrece diferite transformări geochimice, care au făcut ca asemenea colonii să devină centre de sedimentare a compuşilor calcaroşi şi a celor ferici.

Datorită marii lor capacităţi metabolice, exercitate de-a lungul a milioane de ani, bacteriile, deşi au dimensiuni atît de mici, au putut juca un rol importante în istoria planetei, determinînd acumularea unor cantităţi imense de substanţe minerale ($CaCO_3$, depozite de S şi compuşi ai ferului etc.), prin care au contribuit la modificarea aspectului Pămîntului.

1. PRECIPITAREA BACTERIANĂ A SĂRURILOR DE CALCIU ÎN MĂRI

Începînd din 1914, cînd Walcott a presupus că bacteriile au jucat un rol important în geneza maselor enorme de calcar algonkian din regiunea Newland, s-au acumulat numeroase date care pledează pentru participarea bacteriilor la precipitarea calcarului în mări şi oceane. În mediile neoxigenate şi bogate în substanţe organice (lagune, Marea Neagră etc.), precipitarea carbonaţilor se face sub acţiunea bacteriilor anaerobe. După Cayeux, în prezenţa metanului eliberat prin procese metabolice bacteriene, sulfaţii de calcium şi magneziu dau naştere la sulfuri, apă şi CO_2, care, la rîndul lor, intră în în reacţie dînd naştere la carbonaţi de tipul dolomitului şi la H_2S. În apele bine aerate, substanţele organice sînt atacate de o microfloră aerobă, cu formare de NH_3 care, în prezenţa CO_2 dă carbonat de amoniu. Acesta din urmă, în prezenţa sulfatului de calciu din apa de mare, dă naştere la precipitate de carbonat de calciu. Activităţi de acest fel au avut loc şi în decursul epocilor geologice, dînd depozitelor de calcar un aspect ondulat şi concreţionat.

Urmărind fazele depunerii carbonatului de calciu, Isacenko arată că la început acesta sedimentează în stare amorfă, în secreţiile mucilaginoase ale bacteriilor pe care le înconjură, formînd corpusculi centraţi de bacterii. Ulterior, carbonatul de calciu trece în stare de calcit coloidal, după care cristalizează, generînd ooliţi şi sferoliţi în ale căror cristale bacteriile rămîn incluse. În cursul trecerii din stare coloidală în stare cristalină, carbonatul de calciu cimentează depozitele din fundul mării. Astfel, în geneza depozitelor de calcit şi de aragonit din Precambrian intervin atît procese fizico-chimice de sedimentare a carbonatului de calciu cît şi precipitarea acestuia datorită bacteriilor.

După unii autori, precipitarea de origine bacteriană a carbonatului de calciu în mări este produsă de o microfloră specifică (*Bacterium calcis, B. precipitatum*), în timp ce alţii o consideră ca un proces nespecific care poate fi reprodus experimental cu peste 25 de specii bacteriene din sol, mări, oceane, ape dulci şi sărate. Procesele chimice care determină precipitarea de origine bacteriană a carbonatului de calciu nu sînt cunoscute în mod precis în prezent. Ele ar putea decurge după una din următoarele reacţii:

(1) $Ca(HCO_3)_2 + 2NH_4OH \rightarrow CaCO_3 + 2H_2O + (NH_4)_2CO_3$;

(2) $Ca(CH_3COO)_2 + 4O_2 \rightarrow CaCO_3 + CO_2 + 3H_2O$;

(3) $CaSO_4 + CH_3COOH \rightarrow CaCO_3 + H_2S + H_2O + CO_2$;

(4) $Ca(NO_3)_2 + 3H_2 + C \rightarrow CaCO_3 + 3H_2O + N_2$.

2. ROLUL BACTERIILOR ÎN GENEZA DEPOZITELOR DE MINEREU DE FIER

Ehrenberg a sugerat încă din anul 1836 că microorganismele ar juca un rol important în formarea minereurilor de fier ş imangan. Probe directe sînt însă foarte puţine, deoarece „urmele" bacteriilor, ale celor ferice în special, au o viaţă scurtă. Totuşi, în depozitele recente de fier s-au găsit amprente de pe urma bacteriilor ferice.

După datele actuale, se consideră că cele mai mari cantităţi de depozite de fier rezultă din acţiuni pur fizico-chimice sau plutonice, însă există numeroase dovezi ale contribuţiei, cel puţin parţiale, a bacteriilor, de la care ar proveni o parte din hidroxidul feric granular prezent în mîlul minereului de fier. În favoarea rolului bacteriilor în geneza depozitelor de fier pledează mai ales două fapte: *1*) prezenţa unui număr enorm de bacterii ferice (*Leptothrix, Crenothrix, Galllionella*) în depozitele recente de minereu de fier, ca şi în argilele feruginoase fosilifere şi în bancurile de concreţiuni din mări; 2) existenţa în depozitele colorate în cărămiziu şi în depozitele noroioase de pe fundul pîraielor şi al izvoarelor feruginoase a unor filamente de *Leptothrix* sau a altor specii de bacterii ferice.

Bacteriile ferice cresc sub formă de filamente formate din mai multe celule şi se fixează de pietre, de grăunţii de nisip de pe fundul lacurilor şi rîurilor sau de frunzele plantelor acvatice. În cursul metabolismului, ele oxidează mari cantităţi de carbonat de fier la hidroxid de fier coloidal pe care-l depun în capsula gelatinoasă a filamentului bacterian, a cărei greutate poate depăşi de cîteva ori greutatea bacteriei însăşi. Celulele bacteriene moarte se acumulează pe fundul apelor, iar fierul pe care-l conţin se depune pe pietre, pe alge şi pe alte plante acvatice, la început ca mase amorfe, mocirloase, apoi sub formă de concreţiuni.

După datele lui Harder şi Kalimenko, precipitarea bacteriană a concreţiunilor ferice nu este un proces specific, fiind determinat, în afară de bacteriile feruginoase, şi de alte bacterii autotrofe şi heterotrofe, de ciuperci şi de actinomicete. Toate aceste microorganisme ar putea determina trecerea fierului din soluţie în precipitate de hidroxid feric depus iniţial sub formă de flocoane amorfe, adunate în formaţii sferice care devin mai compacte, capătă forme mai definite şi se contopesc, mărindu-şi dimensiunile, pentru a forma micro- şi apoi macroconcreţiuni. O asemenea acţiune exercitată în natură de-a lungul secolelor de miliarde şi miliarde de bacterii explică acumularea depozitelor de minereu de fier de origine bacteriană (biogenă).

3. ORIGINEA BACTERIANĂ A DEPOZITELOR DE SULF

Depozitele naturale de sulf din regiunile în care nu au existat vulcani s-au acumulat ca rezultat al activităţii bacteriene. În lacuri şi mări există numeroase bacterii sulfat-reducătoare, care utilizează O_2 şi liberează cantităţi însemnate de H_2S care se acumulează, spre exemplu, în Marea Neagră, la adîncimi sub 200 m. Alături de acestea există numeroase bacterii din genurile *Thiobacillus, Thiophysa, Thiospira, Beggiatoa, Thiothrix, Thiocapsa, Chromatium* etc., care oxidează H_2S produs pe fundul mărilor şi lacurilor, determinînd apariţia unor grăunţi mici de sulf care se acumulează atît în corpul lor cît şi în mediu. Mase mari de celule bacteriene filamentoase, adeseori gigante, se depun după moarte pe fundul apelor şi, prin descompunerea lor, liberează

sulful care se depozitează. Se apreciază că în felul acesta s-au format marile depozite naturale de sulf descoperite în Caucaz, Asia Centrală, America de Nord etc. De asemenea, depozitele de sulf din Sicilia sînt atribuite acţiunii bacteriilor care în trecut au trăit în condiţii marine similare celor actuale din Marea Neagră. În sprijinul acestei ipoteze se citează procesul natural de formare a unor cantităţi mari de sulf elementar, care are loc în prezent sub acţiunea combinată a bacteriilor sulfatreducătoare şi a celor care oxidează H_2S. În lacurile din Cirenaica, în păturile superficiale ale apei cresc în masă bacterii sulfurice din speciile *Chromatium* şi *Chlorobium*, iar zona de adîncime conţine adevărate culturi de bacterii sulfat reducătoare şi un strat de nămol sulfuros, gros de 150—200 cm. În aceste condiţii, datorită activităţii combinate a bacteriilor care reduc sulfaţii şi a celor care, folosind energia radiantă a luminii solare, oxidează H_2S, un lac conţinînd circa 2 milioane litri apă asigură o producţie continuă de aproximativ 100 tone sulf, care este extras anual.

4. ROLUL BACTERIILOR ÎN FORMAREA ZĂCĂMINTELOR DE SALPETRU

Proprietatea bacteriilor nitrificatoare de a forma depozite de salpetru (KNO_3) în sol este valorificată de secole. Deşi cantitatea de nitrat format pe această cale este la prima vedere mică (60 părţi N nitric la un milion părţi sol), ţinînd seama de volumul imens al solului, ea este în realitate destul de însemnată. Există regiuni în care nitraţii se acumulează în mod natural în cantităţi aşa de mari, încît cristalizează la suprafaţa solului.

Cele mai favorabile condiţii de producere naturală a salpetrului se întîlnesc în regiunile cu climat cald şi lungi perioade secetoase, ceea ce exclude pierderile prin spălare, şi în care îndepărtarea apelor reziduale de canal sau a altor reziduuri azotate se practică după sisteme primitive. Astăzi se extrag aproximativ 10 000 tone de salpetru purificat din pulberile saline care acoperă suprafaţa solului în regiunile centrale ale Indiei şi care s-au format prin procese de nitrificare într-un amestec de sol, urină, bălegar de vacă şi cenuşă de lemn. Depozite similare, dar mult mai mici, există în regiunile calde (Egipt, India etc.), în pămîntul de pe locul cimitirelor abandonate, al vechilor cîmpuri de luptă şi pe pereţii pivniţelor, în care nitratul o dată format, se concentrează prin evaporare sub acţiunea căldurii şi soarelui, depunîndu-se ca o pulbere albă. În mod asemănător s-au constituit de mii de ani depozite de salpetru în marile acumulări de cadavre şi dejecţii, cunoscute sub numele de *guano*, din deşertul Atacama din Chile şi regiunea Pampa Negra din Peru. Sub acţiunea bacteriilor de putrefacţie, guano-ul a fost descompus cu formare de amoniac, care a fost apoi transformat de bacteriile nitrificatoare în nitriţi şi nitraţi. După o altă ipoteză, mare parte din depozitele de salpetru, atît de mult folosit ca îngrăşămînt şi pentru diferite scopuri industriale (fabricarea explozivelor), s-au format pe seama algelor acumulate şi descompuse în canti-

tăţi imense pe coasta oceanelor. Şi în acest caz, rolul microorganismelor este esenţial în degradarea materialului organic cu formare de amoniac, nitriţi şi, în final, nitraţi (salpetru).

5. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN DEZAGREGAREA ROCILOR ŞI COROZIUNEA PIETREI

În condiţii naturale, dezagregarea stratului superficial de carbonat de calciu, componentul principal al rocilor calcaroase, se produce sub acţiunea acidului nitric format în procesul de metabolism al bacteriilor nitrificatoare. În afară de acestea, bacteriile sulfuroase participă activ la procesul de dezagregare a rocilor, prin oxidarea H_2S la H_2SO_4, care dizolvă diferiţi compuşi anorganici, inclusiv calcarul. Bacteriile formatoare de acid sulfuric au o mare importanţă practică în creşterea fertilităţii solului, deoarece, o dată cu dezagregarea rocilor şi mineralelor, liberează în sol diferite elemente folositoare, ca P, Mg, Na ş. a. În felul acesta, fosfatul tricalcic — $Ca_3(PO_4)_2$ — poate fi transformat în acid fosforic solubil, după reacţia:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3H_2SO_4 \rightarrow 2H_3PO_4 + 3CaSO_4.$$

În condiţii de irigaţie, prin activitatea acestor microorganisme, solurile sterile alcaline din deşerturi pot fi transformate în pămînturi fertile.

Unele bacterii intervin în procesele de degradare a zidurilor de cărămidă şi a construcţiilor de beton care pot deveni pe alocuri sfărîmicioase. În porţiunile atacate s-au pus în evidenţă cristale de sulfaţi şi nitraţi. Cea mai mare parte din zidăria degradată din oraşe suferă acest proces printr-o acţiune chimică a atmosferei poluate cu substanţe acide. În afară de aceasta, un rol însemnat revine acţiunii microorganismelor, deoarece fumul eliminat din furnale şi depus pe pereţii umezi conţine H_2S care este oxidat de sulfobacterii cu liberare de acid sulfuric. Acesta, împreună cu acidul nitric produs de bacteriile nitrificatoare, acţionează asupra tencuielii pereţilor, distrugînd-o.

Studiind degradarea microbiană a monumentelor de piatră, Pochon a arătat că din porţiunile alterate se pot izola bacterii care oxidează sulfurile şi hiposulfiţii în sulfaţi. În condiţii experimentale similare celor din natură, pietrele normale însămînţate — în prezenţa unor mici cantităţi de H_2S — cu germeni izolaţi din pietrele atacate *(Thiobacillus thiooxydans)*, suferă o coroziune marcată datorită acizilor formaţi de microorganisme. În ceea ce priveşte sulfurile prezente în resturile de piatră corodată, ele provin fie, în mică parte, din însăşi piatra respectivă, fie, mai ales, din apele de ploaie sau din cele subterane, care s-au ridicat prin capilaritate la suprafaţa solului după reducerea sulfaţilor din ele de către microflora sulfat-reducătoare.

Coroziunea monumentelor de piatră mai poate fi produsă şi de microorganismele nitrificatoare care oxidează amoniacul atmosferic la acizi nitric şi nitros şi folosesc carbonatul din piatră. În aceste cazuri, coroziunea rezultă din spălarea nitritului şi nitratului de calciu.

6. MICROBIOLOGIA PETROLULUI

Microbiologia petrolului [1], unul dintre cele mai noi domenii ale microbiologiei, studiază, pe de o parte, rolul microorganismelor în geneza petrolului, în liberarea şi migrarea lui din roci, cu acumularea lui consecutivă, iar pe de altă parte, posibilitatea de a folosi în practica industrială petrolieră unele activităţi microbiene utile (pentru recuperarea petrolului din roci sau pentru prospectarea zăcămintelor petroliere) şi de a împiedica pe cele dăunătoare (degradarea petrolului şi a produselor petroliere, blocarea microbiană a sondelor de injecţie, coroziunea conductelor etc.).

a. Rolul microorganismelor în formarea zăcămintelor de petrol

Pînă în prezent nici una dintre teoriile asupra genezei zăcămintelor de petrol nu a putut elucida caracterul reacţiilor chimice din care a rezultat acest amestec de substanţe. Teoria biogenezei petrolului porneşte de la ipoteza că acesta este un produs al vieţii din epoci geologice îndepărtate, format prin descompunerea de către microorganisme a resturilor de organisme vegetale şi animale aflate într-un mediu marin la presiuni ridicate şi la temperaturi relativ mici (sub 100°C). Luîndu-se ca premisă această origine organică, s-a ajuns să se admită, aproape în mod axiomatic, participarea bacteriilor şi a altor microorganisme în procesul de formare a petrolului, cu atît mai mult cu cît se ştie că şi astăzi substanţele organice din sedimentele marine sînt expuse la degradarea microbiană.

Argumente în favoarea biogenezei petrolului. Cercetările efectuate în ultimii ani au făcut cunoscute o serie de fapte noi care pledează pentru participarea bacteriilor şi a altor microorganisme la formarea zăcămintelor petrolifere, şi anume:

1) Există bacterii capabile să sintetizeze hidrocarburi pe care le depun în citoplasmă sub formă de constituenţi celulari.

2) Din fermentaţia anaerobă a substanţelor organice rezultă metan (constituent obişnuit al gazelor naturale şi al ţiţeiului), etan, propan, hidrocarburi colorate cu nucleu benzenic, ca şi fenoli, crezoli şi alţi compuşi aromatici caracteristici pentru procesele de degradare a proteinelor sub acţiunea bacteriilor marine.

3) În urma degradării bacteriene anaerobe a grăsimilor în condiţii naturale iau naştere hidrocarburi lichide, iar pe de altă parte, bacteriile capabile să folosească H molecular sintetizează cantităţi apreciabile de substanţe eterosolubile nesaponificabile.

4) În fundul mărilor, în pînzele subterane de petrol şi în petrolul din puţurile de mare adîncime (circa 2 950 m) există un mare număr de microorga-

[1] Denumirea de petrol (lat. *petra* = rocă; *oleum* = ulei) este legată de prezenţa acestui produs în special în roci (roci sedimentare, gresii, roci calcaroase şi dolomite).

nisme (inclusiv bacterii) capabile să trăiască şi să se multiplice în condiţii similare, aşa cum se admite astăzi, celor din momentul formării zăcămintelor petrolifere (temperatura 0—85°C, presiune pînă la 3 000 atmosfere, anaerobioză completă, apă cu diferite grade de salinitate) şi care posedă, în plus, aptitudinea de a metaboliza substanţe organice (de exemplu, fenoli) cunoscute ca rezistente la degradare microbiană sau ca fiind toxice pentru alte microorganisme. Condiţiile de viaţă în aceste medii (în special temperatura şi presiunea) sînt în limite recunoscute astăzi drept compatibile cu viaţa microorganismelor.

5) Experienţele cu diferite microorganisme (inclusiv cele reducătoare de sulfaţi) comune în nămolul din adîncul mărilor au demonstrat rolul acestora în producerea de parafine normale ($C_{20}H_{42}$—$C_{25}H_{52}$) şi de substanţe ceroase asemănătoare celor din ţiţei, în condiţii similare acelor bănuite a fi intervenit în geneza petrolului.

Mecanismul intim al formării petrolului este încă nedesluşit. În ceea ce priveşte participarea microorganismelor, se admite că ele au jucat un rol important într-o primă etapă, aceea de transformare a substanţelor organice într-un precursor al petrolului propriu-zis (protopetrol), a cărui modificare în continuare se produce cu participarea unor factori complecşi de ordin geologic, geochimic şi geofizic.

Zo Bell descrie modul posibil în care ar evolua procesul de transformare a substanţelor organice în cursul formării petrolului: resturile organice vegetale şi animale încep să sufere modificări microbiene la scurt timp după moartea organismelor din care provin, astfel că în prezenţa O_2 liber o mare parte din materialul organic poate fi oxidat sau mineralizat de microorganisme, cu formare de CO_2, H_2O, NH_3, sulfat şi alte substanţe cu moleculă mică. În aceste procese aproximativ 30—40% din carbonul organic poate fi transformat în substanţă celulară bacteriană. O parte din această substanţă, foarte complexă ca structură chimică, împreună cu alte substanţe organice de natură vegetală şi animală rezistă într-un anumit grad la descompunerile microbiene şi formează humusul marin. Acesta, produs de degradare şi sinteză, ca şi humusul din sol, este deci constituit dintr-o acumulare de substanţe de origine vegetală, animală şi microbiană, relativ rezistente la degradarea microbiană şi avînd un conţinut mai mare în C (52—58%) şi mai mic în N decît substanţele din care provin. În condiţii favorabile, sub acţiunea combinată a unor factori microbieni, chimici, fizici şi geologici, humusul marin îngropat în sedimente poate suferi modificări lente al căror rezultat este formarea de ţiţei. Nu se cunosc încă procesele prin care se realizează în prezent transformarea humusului marin în ţiţei, dar este sigur că bacteriile sînt în mare măsură răspunzătoare de formarea humusului. Se ştie, de asemenea, că în absenţa completă a O_2, bacteriile anaerobe atacă lent humusul marin, cu formare de substanţe sărace în O, N, S şi P dar relativ bogate în C şi H, şi prin aceasta mai asemănătoare cu petrolul decît cu compuşii organici de origină, substanţe din care derivă hidrocarburi parafinice, acizi graşi, material lipidic. Ca urmare, în sedimentele marine recente asociate cu humus, se

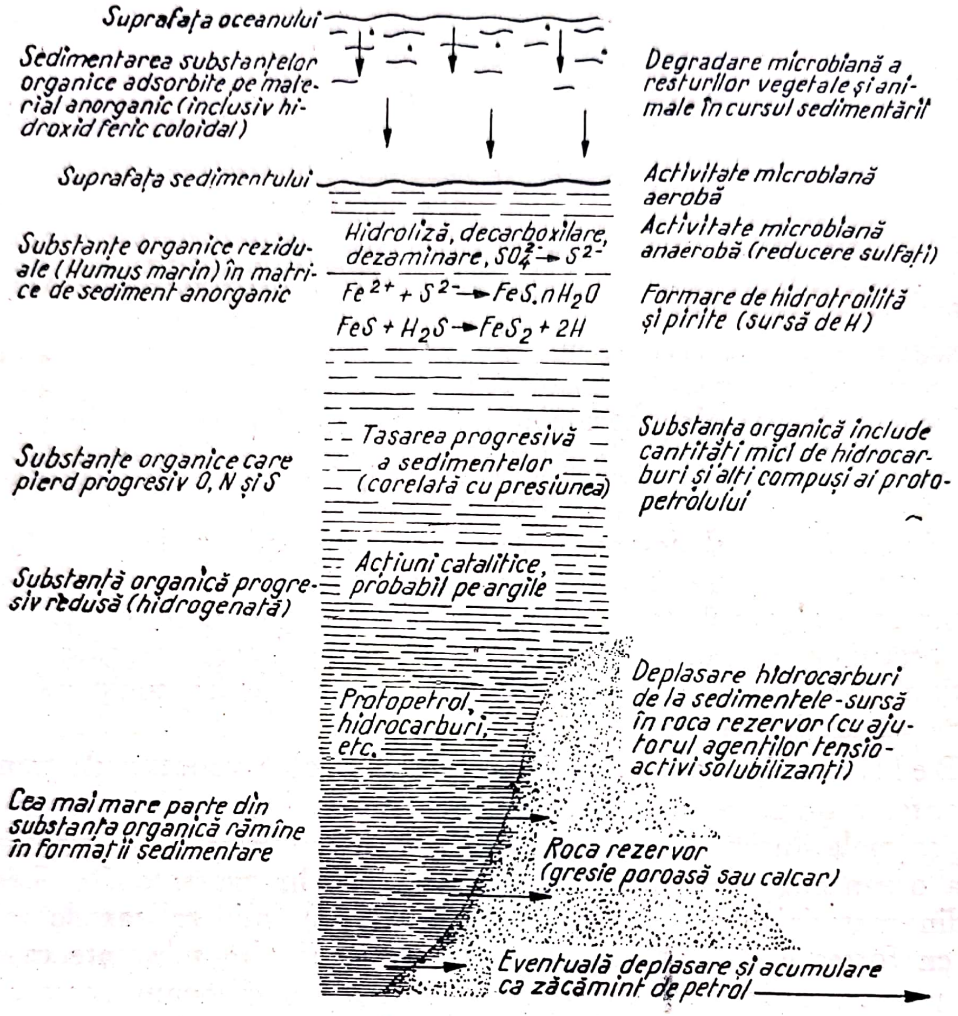


Fig. 444. Principalele etape ale procesului de transformare a substanţelor organice în petrol (după Smith).

găsesc şi hidrocarburi lichide şi solide, provenite în parte din resturi vegetale descompuse şi în parte din corpi bacterieni. Pe măsură ce vîrsta sedimentului creşte, numărul microorganismelor scade; formarea depozitelor de petrol ar necesita 10^5—10^7 ani (Z o B e l l, 1963).

b. Rolul microorganismelor în liberarea, migrarea şi acumularea petrolului

Una dintre cele mai importante funcţii ale bacteriilor în geneza zăcămintelor de petrol este legată de desorbţia sau liberarea petrolului din materialele sedimentare. Aceasta se realizează cel mai adesea prin dizolvarea carbonaţilor de către acizii organici rezultaţi din metabolismul bacteriilor. Astfel, dizolvarea parţială pe această cale a calcarului, a dolomitului sau a altor materiale calcaroase din structura rocilor sedimentare măreşte mult porozitatea şi per-

meabilitatea acestor roci şi, ca urmare, petrolul asociat cu ele este liberat. În plus, formarea concomitentă a unor canale sau spaţii goale în structura rocii dă petrolului posibilitatea de migrare sau de acumulare. Bioxidul de carbon eliberat de bacterii, fie ca produs normal al respiraţiei, fie prin dizolvarea carbonaţilor, tinde să scadă viscozitatea petrolului, favorizînd migrarea şi scurgerea lui, iar creşterea de presiune pe care acumularea acestui gaz o determină deplasează petrolul din „fundurile de sac" şi din spaţiile interstiţiale, împingîndu-l prin spaţiile capilare ale rocilor. În afară de aceasta, tendinţa bacteriilor de a creşte pe suprafeţe solide are ca rezultat îndepărtarea petrolului aderent pe suprafaţa particulelor sedimentare.

În unele ţări aceste proprietăţi sînt folosite în practică pentru a mări extracţia de petrol, prin producerea unor modificări fizico-chimice cu ajutorul bacteriilor care oxidează hidrocarburile şi reduc sulfaţii (*Desulfovibrio hydrocarbonoclasticus, D. halohydrocarbonoclasticus* ş. a.). După formarea petrolului, acţiunea acestor microorganisme — alături de aceea a diferitelor procese tectonice — a contribuit în foarte mare măsură de-a lungul perioadelor geologice la migrarea şi acumularea lui în zăcăminte, uneori în regiuni îndepărtate de locul de origine.

c. Rolul microorganismelor în degradarea produselor petroliere

Diferenţele de compoziţie chimică între diferite petroluri pot fi datorate în mare măsură activităţii microorganismelor. Acestea atacă nu numai petrolul, ci şi o serie de produse petroliere, între care gazul de iluminat, gazolina, kerosenul, uleiul mineral, petrolul lampant şi chiar asfaltul. Această activitate a fost descrisă la aproximativ 100 de specii de bacterii, actinomicete, levuri şi mucegaiuri din genurile *Pseudomonas, Achromobacter, Bacterium, Mycobacterium, Actinomyces, Monilia, Aspergillus, Penicillium* etc., care cresc pe medii minerale îmbogăţite cu hidrocarburi. Unele bacterii pot descompune parafinele, altele petrolul lampant, lipsind astfel petrolul de un component valoros, dar determinînd în acelaşi timp formarea de naftalen, folosit în medicină. Experienţele au arătat că toate tipurile cunoscute de hidrocarburi pot fi degradate dacă se găsesc în stare de dispersie. Degradarea lor este mai intensă atunci cînd sînt conservate vreme îndelungată în prezenţa apei şi, în special, în aerobioză. În aceste condiţii, microorganismele distrug chiar hidrocarburi recunoscute ca antiseptice: benzenul, xilolul, toluolul, crezolii, naftalenul etc. Activitatea microorganismelor amintite este deosebit de intensă. *Bacterium benzoli* distruge un gram de ţiţei în 8 zile, iar microflora naturală din 4 000 g sol la care s-au adăugat 200 g petrol descompune 100 g din acesta în aproximativ 56 de zile.

Dovada capacităţii unor specii microbiene de a utiliza petrolul ca substrat nutritiv o constituie faptul că adăugarea petrolului în sol face să crească populaţia microbiană totală, dar restrînge foarte mult numărul speciilor, favorizînd numai dezvoltarea acelora care sînt capabile să-l degradeze în compuşi mai puţin complecşi. Prezenţa microorganismelor care oxidează hidrocarburile

explică dispariţia rapidă a petrolului din solul din jurul rafinăriilor şi al exploatărilor petrolifere, din conductele sparte, din cursurile de apă poluate etc. În unele cazuri, aceste microorganisme pot produce pagube mari, prin degradarea produşilor păstraţi în bazine ori în tancuri în contact cu apa, sau chiar explozii, ca în cazul descompunerii microbiene a kerosenului din care rezultă metan şi hidrogen. În sfîrşit, mciroorganismele pot determina descompunerea asfaltului aflat în contact cu solul, de exemplu, la nivelul fundaţiilor de clădiri sau al zidurilor, unde stratul de asfalt este folosit ca izolant împotriva apei.

d. Utilizarea bacteriilor în explorările petroliere

Metodele de prospectare geomicrobiologică a petrolului folosesc microorganismele pentru detectarea zăcămintelor de petrol, fără cercetarea directă a prezenţei petrolului sau a gazelor. Utilizarea unor astfel de metode a fost sugerată de constatarea unei liberări foarte lente de hidrocarburi volatile din depozitele subterane, precum şi de observarea constantă a unui mare număr de bacterii care oxidează aceste hidrocarburi (etan, butan, propan) în solul de la suprafaţa sau din apropierea cîmpurilor petrolifere.

Metoda microbiologică de prospectare a zăcămintelor de petrol şi gaze este folosită în parctică în trei variante corespunzînd: *a)* analizei microbiologice a carotelor obţinute prin foraj („biocarotaj"); *b)* determinării bacteriilor indicatoare de hidrocarburi care se dezvoltă în apele subterane („prospectarea apei") şi *c)* prospectării microbiologice propriu-zise, reprezentată de coborîrea în puţuri de mică adîncime a unor bacterii indicatoare însămînţate în medii minerale lipsite complet de C. În această ultimă variantă, dezvoltarea unei culturi microbiene, la cîteva zile de la însămînţare, indică prezenţa unor hidrocarburi volatile care trădează existenţa unui zăcămînt petrolier subteran. Metoda este foarte sensibilă, putînd evidenţia cantităţi de hdirocarburi volatile nedecelabile prin metode chimice.

7. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA TURBEI

Ipoteza originii microbiene a turbei a fost emisă de W a k s m a n, care a arătat amploarea proceselor microbiologice în cursul primelor stadii ale turbificării.

Microorganismele reprezintă factorul determinant al tuturor fenomenelor de degradare şi sinteză pe care le suferă substratul vegetal depus de-a lungul mileniilor, pînă să ajungă la stadiul de turbificare. Transformările materialelor vegetale încep în straturile superioare bine aerate, unde se produc procese oxidative puternice, în timp ce în profunzime, în straturile de depozitare, se produc procese foarte lente, în special anaerobe, de carbonizare.

Turba este, prin urmare, un mediu biologic al cărui conţinut în microorganisme este în raport cu concentraţia substanţelor organice. Microflora ei este

formată din organisme adaptate la lipsa de oxigen, la un *p*H acid şi la presiuni ridicate. De aceea, ea se adaptează greu la cultivarea în medii artificiale şi încetează să crească în subculturi. În straturile superficiale, microflora este eterogenă, fiind formată mai ales din diferite specii comune în sol, în timp ce în straturile profunde predomină bacteriile Gram-pozitive.

În ţara noastră, microflora turbăriilor a fost studiată la Poiana Stampei, unde s-a evidenţiat prezenţa bacteriilor din genurile *Bacillus (B. mycoides, B. cereus, B. subtilis, B. brevis), Clostridium, Cellvibrio, Cellfalcicula, Pseudomonas, Achromobacter* ş. a.

8. ROLUL MICROORGANISMELOR ÎN FORMAREA ZĂCĂMINTELOR DE CĂRBUNI

Problema modului de formare a zăcămintelor carbonifere nu este încă elucidată. Prezenţa bacteriilor în cărbune, în condiţii în care nu se putea admite o contaminare exogenă prin greşeli de tehnică sau prin infiltraţii de apă, a făcut pe Lipman să emită ipoteza că ele au supravieţuit în stare latentă încă din epoca formării acestuia, adică de milioane de ani. Supravieţuirea bacteriilor de-a lungul diferitelor etape care au dus la formarea cărbunilor ar sugera că acest proces nu s-a produs la temperaturi ridicate sau că, în condiţiile formării depozitelor de cărbuni, bacteriile ar fi mai rezistente decît în alte condiţii. În acord cu această concepţie, se consideră că diferitele zăcăminte de cărbuni (antracit, lignit etc.) s-ar forma pe seama humusului care, la rîndul său, este un produs rezultat din acţiunea completă de degradare şi sinteză realizată de microorganisme asupra resturilor vegetale (*combustibile humice*). Procesul s-ar fi desfăşurat lent, probabil la temperaturi şi presiuni care nu au influenţat viabilitatea microorganismelor, asigurînd de-a lungul sutelor şi milioanelor de ani formarea actualelor bazine carbonifere.

O dovadă suplimentară a participării microorganismelor în geneza cărbunelui este furnizată de prezenţa urmelor de spori, bacterii şi ciuperci microscopice alături de resturile vegetale fosile şi chiar în structura unor cărbuni. De exemplu, pe suprafaţa lamelelor subţiri de clivaj ale cărbunilor din bazinul carbonifer al Moscovei, s-au putut evidenţia cu metode speciale urme care sînt asemănătoare ca formă şi dimensiuni, cu cocii de astăzi. De asemenea, Renault a pus în evidenţă în parenchimul resturilor vegetale din compoziţia huilei prezenţa unor bacterii, ca: *Bacillus vorax, Micrococcus guignardi, M. hymenophagus,* şi *Streptothrix anthracis,* datînd din Carboniferul inferior.

NOŢIUNI DE MICROBIOLOGIE INDUSTRIALĂ

Microbiologia industrială este o ramură aplicativă a ştiinţelor microbiologice, avînd ca obiect studiul caracteristicilor biologice şi biochimice, precum şi al condiţiilor optime de activitate ale microorganismelor care, prin fermentaţii sau biosinteze, determină formarea în cantităţi relativ mari a unor substanţe cu valoarea utilitară. De asemenea, ea studiază rolul microorganismelor în apariţia de modificări utile ale unor produse alimentare, precum şi posibilităţile de combatere a microorganismelor dăunătoare pentru evoluţia normală a proceselor fermentative sau pentru buna conservare a produselor alimentare.

Deşi natura microbiană a proceselor fermentative a fost stabilită abia în secolul al XIX-lea, fermentaţiile ca atare sînt cunoscute din cele mai vechi timpuri, unele dintre ele chiar din epoca preistorică. Mult timp ele au fost folosite empiric, iniţial numai în gospodărie (de exemplu, la prepararea oţetului şi a murăturilor, dospirea pîinii, topitul inului etc.), iar ulterior şi în industrii mai mult sau mai puţin dezvoltate.

Natura biologică a proceselor fermentative a fost descoperită însă abia de Pasteur, în perioada 1857—1877, în urma cercetărilor sale asupra „bolilor" proceselor de fermentaţie. Cu această ocazie, Pasteur a stabilit cîteva din principiile fundamentale ale microbiologiei şi a demonstrat că alterările observate în cursul proceselor fermentative sînt provocate de microorganisme contaminante care inhibă dezvoltarea microorganismelor utile sau chiar le distrug. Prin activitatea lor vitală aceste microorganisme contaminante determină formarea unor substanţe nedorite (acizi şi alcooli), care influenţează nefavorabil metabolismul microorganismului util şi scad randamentul producţiei prin metabolizarea produşilor finali rezultaţi din fermentaţia principală sau prin consumarea substanţelor din mediu, indispensabile pentru activitatea microorganismului producător.

Fermentaţiile sînt procese biochimice determinate de enzimele unor microorganisme (bacterii, levuri, mucegaiuri), *care au proprietatea de a degrada în anaerobioză diferiţi compuşi organici cu formarea de substanţe cu o constituţie chimică mai simplă.*

Termenul generic de *fermentaţie* (de la lat. *fervere*=a fierbe) a fost ales pentru a indica aspectul de lichid care fierbe, caracteristic pentru faza de intensitate maximă a procesului fermentativ, aceea în care, datorită liberării

CO_2 sub formă de bule de gaz, se produce o efervescență a mediului lichid, în special în vasele foarte mari (de exemplu, la mustul de struguri care fermentează alcoolic).

Wilkinson și Rose consideră că termenul de fermentație trebuie limitat la acele reacții producătoare de energie în care substanțele organice acționează atît ca donator, cît și ca acceptor de electroni. Prin această delimitare, fermentațiile sînt deosebite, pe de o parte, de respirația anaerobă a microorganismelor care își obțin energia din oxidări în care sînt folosiți ca acceptor de electroni diferite substanțe anorganice, iar pe de altă parte, de respirația aerobă în care ultimul acceptor de electroni este reprezentat de O_2 molecular.

În mod impropriu, termenul de fermentație este folosit în practică și pentru unele procese bazate pe cultivarea microorganismelor în condiții de aerobioză riguroasă (de exemplu, „fermentația" acetică bazată pe oxidarea etanolului la acid acetic sau faza de „fermentație" de la fabricarea antibioticelor, corespunzînd creșterii miceliului și biosintezei antibioticului).

Deoarece fermentațiile, studiate o dată cu apariția microbiologiei industriale ca știință, reprezintă în majoritatea cazurilor procese de degradare a glucidelor, pentru mulți autori utilizarea termenului de fermentație este limitată la descompunerea microbiană a acestor substanțe. Într-o concepție mai largă, unii autori moderni încadrează în același grup de fenomene și degradările microbiene ale proteinelor, lipidelor, acizilor organici, alcoolilor etc., noțiunea de fermentație căpătînd prin aceasta un sens mai larg (Prescott).

De cele mai multe ori, unul dintre produșii rezultați predomină cantitativ și ca atare caracterizează procesul de fermentație care, de aceea, poartă numele produsului respectiv (fermentație alcoolică, lactică, butirică, propionică etc.). În alte cazuri însă, produșii finali rezultați din fermentația diferitelor substanțe carbonate sînt mai numeroși și mai variați, fără ca vreunul dintre ei să fie caracteristic sau dominant. Astfel, *Escherichia coli* fermentează manita, glucoza și acizii gluconic, glucuronic și zaharic, formînd totdeauna cantități variabile de acizi lactic, succinic, acetic și formic, de alcool etilic și de bioxid de carbon.

Inițial, fermentațiile industriale se produceau sub acțiunea microflorei „spontane" (sălbatice), care se găsea pe suprafața sau în interiorul produsului supus fermentației. Practica a arătat însă că microorganismele specifice neselecționate pot să fie slab sau inegal active, în afară de faptul că microflora asociată include adesea și specii dăunătoare, a căror activitate diminuează calitatea produsului final. În prezent, pentru a se preveni aceste inconveniente se recurge de cele mai multe ori în industrie la microorganisme selecționate, cu ajutorul cărora se obțin constant produse de calitate superioară, se scurtează durata procesului tehnologic și se îmbunătățește randamentul, deoarece tulpinile selecționate suportă concentrații mari din produsul final.

Spre exemplu, mutantele de *Penicillium chrysogenum* utilizate la producția penicilinei produc cantități de antibiotic de 5 000 de ori superioare celor elaborate de tulpina izolată din natură.

Este de dorit ca microorganismele utilizate în industria fermentativă să posede între altele, două particularități biochimice, și anume: 1) să aibă capa-

citatea de a utiliza cea mai mare parte din substrat prin calea principală de degradare, cu producerea unei cantităţi maxime de produs util şi fără pierderi determinate de utilizarea produşilor intermediari pentru diferite biosinteze şi 2) să tolereze cantităţi mari din produsul final şi să fie incapabile să-l metabolizeze, ceea ce asigură acumularea lui în mediu.

În raport cu aceste condiţii, bacteriile lactice homofermentative sînt foarte potrivite utilizării industriale, deoarece calea lor metabolică principală *(Embden-Meyerhof-Parnas)* nu este cuplată cu alte procese metabolice, iar aptitudinea lor de a metaboliza lactatul produs în cantitate mare pe această cale este nulă, ceea ce permite o producţie de acid lactic mergînd pînă la 90—98% în raport cu zahărul fermentat.

Utilizarea microorganismelor în industrie este deosebit de indicată datorită proprietăţilor lor biologice particulare. În primul rînd, viteza deosebit de mare a reacţiilor metabolice ale microorganismelor face ca procesele de sinteză (de exemplu, sinteza proteinelor bacteriene) să se facă extrem de rapid faţă de procesele similare la plantele superioare şi la animale. De asemenea, microorganismele pot produce în cîteva ore degradări, modificări şi substituiri ale componentelor diferitelor substraturi pe care se dezvoltă, realizînd astfel cu uşurinţă transformări biochimice a căror obţinere prin metode chimice ar necesita uneori un număr mare de operaţii laborioase şi o tehnicitate ridicată. Pe de altă parte, datorită plasticităţii metabolismului lor, respectiv capacităţii lor de adaptare la medii cu compoziţii chimice foarte diferite, microorganismele se pot dezvolta pe o gamă foarte întinsă de materii prime, uneori lipsite de valoare economică, ceea ce permite utilizarea unor materiale foarte ieftine pentru obţinerea pe cale biologică a unei serii largi de produse utile.

În ultimii ani, progresele mari înregistrate în domeniul industriei de sinteză au determinat scăderea importanţei economice a unor procese tehnologice bazate pe activitatea fermentativă microbiană. Astfel, alcoolul etilic, acetona şi butanolul pot fi preparate mai uşor şi cu randament mai mare în industria petrochimică. La fel, sinteza acizilor lactic şi acetic pe cale chimică este mai raţională din punct de vedere economic decît cea realizată pe cale microbiană. Indiferent de gradul de dezvoltare al industriei de sinteză, există însă cîteva domenii în care utilizarea microorganismelor nu poate fi înlocuită sau rămîne totuşi cea mai indicată. Între acestea trebuie menţionate procesele tehnologice de valorificare a unor substraturi din categoria deşeurilor lipsite de valoare economică, producerea de masă celulară microbiană utilizată ca atare (drojdie comprimată, drojdii furajere), sau sub formă de preparate enzimatice, producţia de substanţe greu sau chiar imposibil de obţinut pe cale de sinteză (hormoni corticosteroizi, vitamina B_{12} etc.) şi, în sfîrşit, fabricarea unor băuturi (vin, bere etc.) sau produse utilizate în alimentaţie.

Metoda biologică este îndeobşte preferabilă celei chimice, în cazurile în care produsele respective sînt destinate consumului alimentar. Astfel, oţetul obţinut prin fermentarea vinului sau a altor băuturi alcoolice este superior aceluia preparat din esenţă de oţet, deoarece conţine vitamine din grupul B şi diferiţi aminoacizi, care atenuează gustul acru, aspru, al acidului acetic, îl fac uşor

suportat de stomac prin acţiunea lor de tampon şi îi conferă, în plus, o aromă plăcută. În mod similar, băuturile alcoolice obţinute prin fermentaţii naturale sînt superioare calitativ prin „buchetul" lor, datorat prezenţei asociate a diferiţi alcooli, aldehide, esteri etc., care se formează pe lîngă alcoolul etilic, în cursul acestor procese microbiene.

1. FERMENTAŢIA ALCOOLICĂ

Alcoolul etilic sau *etanolul* (CH_3CH_2OH), cunoscut încă din secolele IX—X î.e.n. şi folosit la început ca ofrandă pentru zei sau ca un remediu împotriva tuturor bolilor, se obţine pe cale chimică sau prin fermentarea completă, în special de către unele drojdii, a diferite substanţe hidrocarbonate, urmată de separarea prin distilare şi purificare a alcoolului obţinut. Fermentaţia alcoolică este una dintre cele mai importante fermentaţii industriale, deoarece alcoolul este întrebuinţat curent în industria alimentară, chimică, farmaceutică, a parfumurilor şi a cauciucului.

Materiile prime foarte ieftine şi abundente cantitativ, care pot fi folosite în fabricarea prin fermentaţie a alcoolului etilic sînt reprezentate de: *1*) materii prime *amidonoase* (cartof, porumb, orz, secară ş.a.), utilizabile după transformarea hidrolitică a amidonului din compoziţia lor în zaharuri simple fermentescibile de către levuri; *2*) materii prime *zaharoase*, ca: trestie sau sfeclă-de-zahăr, sucuri de fructe, melase (deşeuri de la fabricarea zahărului) şi leşii sulfitice (soluţii reziduale de la fierberea lemnului utilizat la fabricarea hîrtiei, conţinînd 1—5% zahăr); *3*) materii prime *celulozice* (lemn şi stuf), care prin fierbere cu acizi sub presiune, se hidrolizează cu formare de hidrocarbonate mai simple, fermentescibile.

Toate aceste materii prime au însuşirea de a nu putea fi utilizate ca atare de microorganismele capabile să producă fermentaţia alcoolică. De aceea, înainte de folosirea lor în fermentaţiile industriale, amidonurile, celulozele şi hemicelulozele trebuie hidrolizate sau convertite în zaharuri cu molecule relativ simple şi fermentescibile. În acest scop, materia primă poate fi tratată în mod diferit, şi anume cu unele preparate enzimatice de origine vegetală, ca malţul [1] de cereale („zaharificarea cu malţ"), cu enzime de natură microbiană ca amilaza din *Aspergillus oryzae* (sub forma adăugirii de masă miceliană în proporţie de 10% la temperatura de 60°C) sau cu acizi (HCl sau H_2SO_4) diluaţi. Zaharificarea cu acizi are avantajul că permite sterilizarea mustului, dar reduce randamentul în alcool şi scade valoarea borhotului rămas după fermentaţie.

[1] *Malţul* este un produs enzimatic preparat de obicei din orz de bună calitate, selecţionat pentru a avea o mare capacitate de germinare (minimum 95%) şi o mare energie de germinare (să germineze în timp scurt). În timpul germinaţiei, în orzul încolţit se produc multe modificări metabolice, între care formarea unei cantităţi mari de enzime sau activarea celor existente. Înainte de a fi utilizat pentru zaharificare, malţul, care nu se poate păstra verde, este măcinat şi uscat.

a. Fabricarea alcoolului etilic din cartofi şi cereale

În acest proces de fabricaţie, folosit pe scară largă în ţara noastră, materia primă vegetală care conţine amidon este tratată în prealabil în aşa fel încît să devină un mediu favorabil pentru multiplicarea drojdiilor, respectiv să conţină zahăr fermentescibil.

Pentru aceasta, ea este supusă la fierbere sub presiune (1 oră la 2,5—3 atmosfere), urmată de trecere bruscă la presiunea normală. Ca urmare, celulele plesnesc, iar granulele de amidon se dezagregă, transformîndu-se într-un terci (clei sau cocă) de amidon. Deoarece levurile nu au în echipamentul lor enzimatic amilaze, terciul de amidon este supus în prealabil unui proces de zaharificare cu malţ prin care amidonul este descompus, cu formare de glucide mai simple.

Pentru zaharificare, terciul de amidon este tratat $1^1/_2$ oră la 60—62° cu malţ măcinat şi amestecat cu apă, în care timp amilaza hidrolizează amidonul cu formare de maltoză (25—30% din plămadă) şi dextrine. Produsul rezultat, plămada dulce, reprezintă un mediu de cultură adecvat pentru microorganismele care produc fermentaţia alcoolică (levuri din genul *Saccharomyces*, bacterii ca *Bacillus macerans, Sarcina ventriculi* etc.).

Fermentaţia alcoolică poate fi *spontană* — sub acţiunea microorganismelor „sălbatice" prezente în sol şi aduse pe suprafaţa plantelor de către vînt, ploi şi insecte — sau *dirijată* prin introducerea în materialul de fermentat a unor drojdii, special „selecţionate", din grupul drojdiilor de fermentaţie superioară care au o energie maximă de fermentaţie. Drojdiile de fermentaţie superioară (de suprafaţă) au proprietatea de a se ridica la suprafaţa lichidului în timpul fermentaţiei, dînd o spumă bogată cu aspect mat sau formînd cel mult un depozit cu aspect pulverulent. Temperatura lor optimă de activitate este de 28—32°C. În afară de un randament ridicat al producţiei de alcool, tulpinile selecţionate pentru industrie au proprietatea de a suporta prezenţa acestuia în mediu şi de a nu consuma cantităţi mari de hidrocarbonate pentru sintezele lor proprii.

Aceste drojdii au un echipament enzimatic foarte bogat, graţie căruia obţin în mediu anaerob energia necesară manifestărilor lor vitale, prin procesul de *fermentaţie alcoolică* a hidrocarbonatelor după reacţia globală:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3—CH_2OH + 2\ CO_2.$$

În realitate, mersul reacţiei este mult mai complicat, aşa cum reiese din figura 445, pe lîngă alcool etilic şi CO_2 formîndu-se şi numeroşi compuşi secundari de fermentaţie.

Fermentaţia alcoolică durează 72 de ore şi are trei faze succesive: *1) faza preliminară* — de fermentaţie lentă, cu o durată de circa 20 ore la 28°C — care este caracterizată prin degajarea slabă de CO_2 şi ridicarea moderată a temperaturii şi care corespunde perioadei de multiplicare a drojdiilor; *2) faza principală de fermentaţie*, cu o durată de circa 18 ore, în care multiplicarea drojdiei încetează, iar fermentaţia este zgomotoasă, tumultuoasă, însoţită de o degajare intensă de CO_2, creşterea temperaturii şi formarea unui strat de spumă la suprafaţă; *3) faza de fermentaţie complementară*, liniştită, cu degajare lentă de CO_2, care durează 24—30 de ore la o temperatură de circa 28°C.

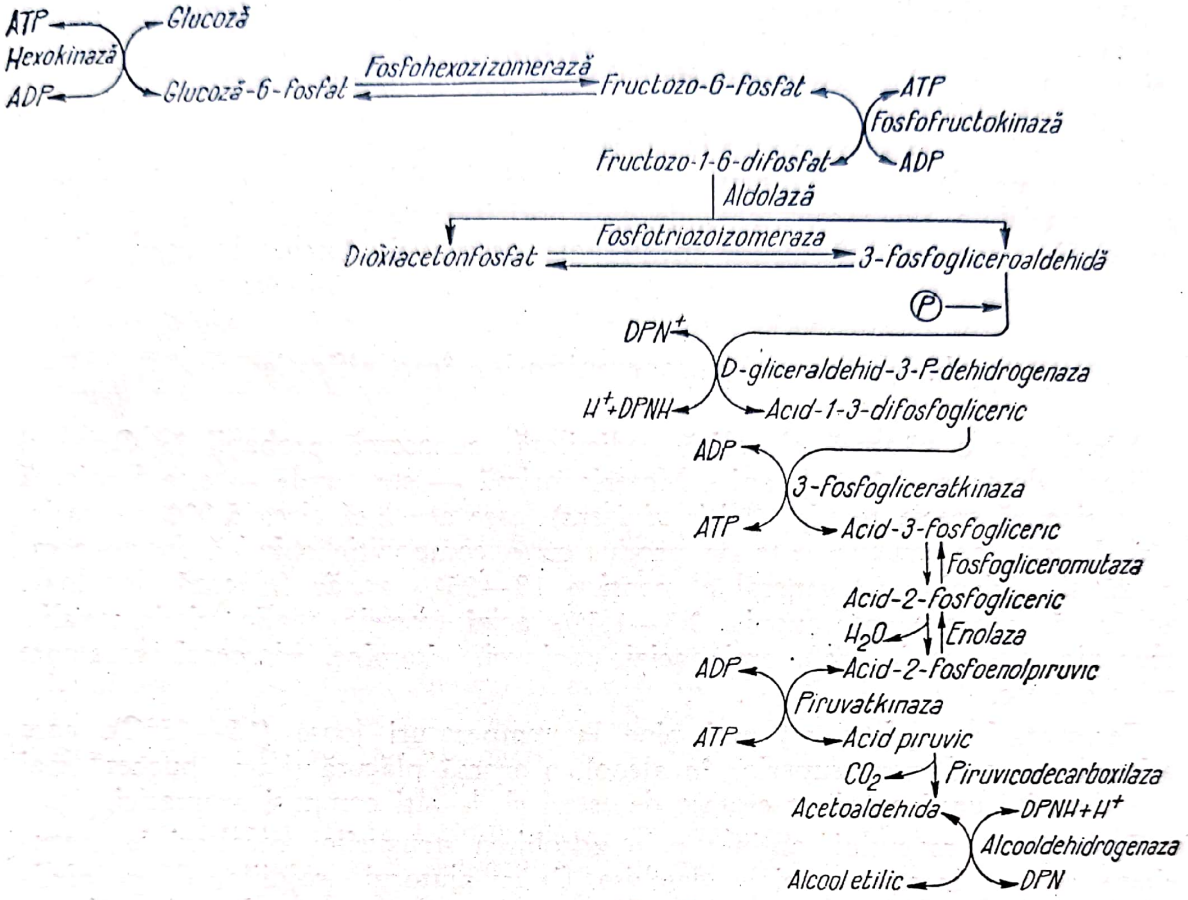


Fig. 445. Schema reacţiilor intermediare ale fermentaţiei alcoolice a glucozei de către levurile din genul *Saccharomyces*.

Produsul rezultat conţine alcool, în concentraţie de 10—12%, şi diferiţi produşi secundari ca acetaldehidă, glicerină, acizi organici volatili şi alcooli superiori, care-i dau gust şi miros neplăcut. Prin distilarea lui se obţin separat spirtul brut (concentraţie în alcool etilic 75—85%) şi borhotul (reziduul după distilare). Alcoolul brut conţine — în afară de alcool etilic şi o cantitate mică de glicerol — produsul denumit *ulei de fuzel*.

Pentru eliminarea acestor impurităţi, alcoolul brut suferă un proces de rafinare sau rectificare prin distilare fracţionată. Uleiul de fuzel, care se separă prin diluarea ultimei porţiuni din distilatul de rafinare, este format dintr-un amestec de alcooli amilic, isoamilic, propilic şi butilic, acizi acetic şi butiric, diferiţi esteri etc. El este folosit în industria chimică drept materie primă pentru prepararea de solvenţi necesari în industria lacurilor şi în prepararea a diferite esenţe alimentare.

Fermentaţia alcoolică are numeroase aplicaţii practice în industrie, fiind utilizată în producţia spirtului şi a băuturilor spirtoase, la fabricarea vinului, a berii, a sucurilor de fructe şi în panificaţie.

Băuturile alcoolice naturale se prepară prin distilarea produselor obţinute în urma fermentaţiei alcoolice a diferitelor fructe (prune, mere, cireşe, vişine, piersici, dude etc.), folosindu-se drojdiile de pe fructe sau unele tulpini selecţionate. Produsul rezultat din fermentaţie este concentrat prin distilare şi redistilare, pînă la o concentraţie în alcool de 45—50°. În acest caz, pe lîngă alcool se mai formează în cursul fermentaţiei diferiţi alcooli şi esteri (în proporţii variabile, după cantitatea de aminoacizi prezenţi în lichidul supus fermentării), care dau băuturilor menţionate aroma şi „buchetul" caracteristic.

b. Utilizarea microorganismelor în vinificaţie

Vinul este o băutură alcoolică nedistilată, cunoscută probabil în Orientul Mijlociu de acum 6 000 de ani [1]. Materia primă — strugurele — este furnizată de o singură specie de viţă (*Vitis vinifera*), care are însă circa 5 000 de varietăţi. Mustul de strugure este un produs cu o compoziţie chimică foarte complexă şi variabilă; în general el conţine 18—25% zahăr (glucoză, levuloză, zaharoză, pentoze, pentozani), 0,3—1,5% acizi (tartric, malic, citric, oxalic, gluconic, glucuronic etc.), aminoacizi, taninuri, vitamine, pigmenţi, substanţe minerale etc.

Fermentaţia se face cel mai bine la temperaturi joase (15—25°C), care asigură un randament superior în alcool, o aromă plăcută şi un „buchet" mai ales datorită unui conţinut crescut de esteri şi de alţi compuşi aromatici.

Fermentaţia mustului, obţinut prin zdrobirea strugurilor recoltaţi la maturitate, se face în vase speciale, deschise, fie cu ajutorul drojdiilor de pe pieliţele boabelor (*Saccharomyces ellipsoideus, S. apiculatus* etc.), fie sub acţiunea unor drojdii selecţionate.

În multe cazuri este posibil să se obţină un vin foarte bun, fără precauţii speciale, sub acţiunea microflorei variate de pe suprafaţa boabelor de struguri. De cele mai multe ori însă producătorul îşi asigură calitatea produsului final, distrugînd sau inhibînd dezvoltarea acestor microorganisme (levuri sălbatice, mucegaiuri, bacterii acetice etc.), prin tratare cu sulfiţi (metabisulfit de potasiu) sau bioxid de sulf, după care se introduc în must „starteri" de fermentaţie reprezentaţi prin culturi de levuri specifice selecţionate.

Fermentaţia trece prin trei faze succesive: *a) faza I, de multiplicare a drojdiei,* care durează 3—4 zile; în cursul ei, mustul se tulbură şi degajă o cantitate mică de CO_2; *b) faza a II-a, de fermentaţie zgomotoasă* (tumultuoasă), cu durata de 6—14 zile, caracterizată prin degajarea puternică de CO_2 cu sgomot şi spumă abundentă; *c) faza a III-a (finală), de fermentaţie limitată,* cu durata de 5—6 săptămîni, în care, din cauza alcoolului format, fermentaţia se face lent, cu degajare slabă de CO_2, şi care încetează atunci cînd conţinutul mustului în zahăr a ajuns la 0,1—0,2%.

[1] Pe unele pietre funerare din Egipt (2 500 î.e.n.) sînt reprezentate scene din activitatea de preparare a vinului.

În cursul fermentației alcoolice, conținutul mustului în zahăr, substanțe azotate și minerale scade, lichidul de fermentație îmbogățindu-se cu unele substanțe noi: alcool pînă la 8—20°, CO_2 și mai ales o serie de produși secundari, cantitativ variabili (după natura materiei prime folosite și calitățile levurilor), ca glicerina, acetaldehida, acizi (acetic, lactic, succinic, citric), alcooli superiori (izoamilic, izobutilic etc.) și diferiți esteri. Vinul astfel obținut poate fi „sec", atunci cînd fermentația zaharurilor este practic completă sau, din contră, mai „licoros" (vin dulce, de desert, muscat), atunci cînd fermentația nu este dusă pînă la capăt și, din această cauză, vinul mai conține o cantitate mare de zahăr, perceptibil la gust. După opinia experților în vinificație, aroma este o proprietate care ține de substratul fermentației, respectiv de „parfumul" strugurelui, în timp ce „buchetul" este rezultatul modificărilor produse de microorganisme în cursul fermentației și apoi în procesul de maturare.

La sfîrșitul fermentației, vinul suferă un proces de limpezire, prin precipitarea și depunerea substanțelor tanoase, a pectinelor, a acidului tartric și prin aglutinarea și sedimentarea drojdiilor. Modificările chimice continuă în procesul foarte complex (oxidări, reduceri, esterificări) al maturării în budane, proces care durează de la cîteva luni pînă la 2 ani. Celulele de drojdie se distrug, ceea ce stimulează creșterea lactobacililor care atenuează aciditatea prin transformarea acidului malic în acid lactic și face să dispară gustul de levură și asprimea vinului. În această fază, „buchetul" se ameliorează prin esterificarea alcoolilor superiori și a unei părți din alcoolul etilic cu diferiți acizi existenți, iar culoarea vinului se modifică.

Alterarea microbiană a vinurilor — studiată pentru prima dată sistematic de Pasteur — este determinată de multiplicarea unor microorganisme străine, provenite de pe struguri, din aer sau din vase, care produc așa-zisele „boli" ale vinului ca „floarea vinului", oțetirea sau borșirea.

Specii de *Leuconostoc* și *Lactobacillus* transformă zahărul rezidual în acid lactic și alți acizi organici, producînd în același timp tulburarea vinului, alterarea culorii lui și un gust dezagreabil. Bacteriile acetice (*Acetobacter aceti* și *A. suboxydans*) oxidează etanolul la acid acetic, iar unele drojdii alcoolotolerante (*S. cerevisiae, S. oviformis, Zygosaccharomyces acidifaciens*) produc, de asemenea, tulburarea vinului asociată cu modificări de gust și miros, care scad valoarea economică a vinurilor sau le fac chiar neconsumabile.

c. Utilizarea microorganismelor în industria berii

Berea este o băutură alcoolică nedistilată, obținută prin fermentarea mustului extras din malțul de orz, conținînd 1,5—6% alcool, dextrină, maltoză, peptone și aminoacizi care îi conferă și o valoare nutritivă.

Băuturi similare au fost cunoscute pe valea Nilului, a Tigrului și a Eufratului, încă de acum 6 000 de ani. Berea propriu-zisă s-a preparat pentru prima oară în Alsacia, în secolul al VII-lea, prin adăugarea hameiului, iar denumirea sa, derivată de la cuvîntul *baere*=orz, datează din jurul anului 1480. Pro-

ducţia acestei băuturi cuprinde trei etape principale: *a) prepararea malţului, b) producerea mustului* şi *c) fermentaţia.*

Prepararea malţului sau *maltajul* are ca scop producerea de enzime necesare procesului de zaharificare. Materia primă uzuală conţine polizaharide care nu sînt accesibile echipamentului enzimatic al levurilor decît după o degradare prealabilă la molecule mai mici. Boabele de orz selecţionate şi calibrate (pentru îndepărtarea celor mici) apoi înmuiate în apă timp de 2 zile (cu schimbarea repetată a apei şi chiar cu insuflare de aer) sînt puse la germinat la temperatura de 10—15°, fie întinse în strat subţire pe o suprafaţă netedă, fie aşezate în dispozitive speciale care asigură aerarea şi întoarcerea lor periodică (pentru a preveni alterările prin „încingere", mucegăire sau fermentaţie). În cursul acestei faze se produce germinarea boabelor de orz însoţită de acumularea unei cantităţi importante de enzime (α şi β-amilaze, enzime proteolitice etc.) şi de o dezagregare parţială a celulelor care face bobul friabil şi uşor de broiat. Produsul obţinut după 6—9 zile (malţul verde) este oprit în dezvoltare prin uscare la cald, care omoară embrionul fără să distrugă amilazele şi conferă malţului o aromă specială şi o culoare care rămîn caracteristice berii. Uscarea se face 10 ore la temperatura de 85°C (malţul „blond") sau 36 de ore cu „prăjire" la 90—100°C (malţul „brun", parţial caramelizat, cu o parte din enzime distruse). După îndepărtarea rădăcinilor încolţite, care dau un gust neplăcut, boabele sînt sfărîmate mărunt prin măcinare (malţ uscat).

Prepararea mustului sau *brasajul* are ca scop pregătirea plămezii zaharificate care serveşte ca mediu de cultură pentru microorganismele producătoare de fermentaţie. În cursul acestei faze, sub acţiunea apei calde este favorizată extracţia din malţ a diferiţilor produşi solubili (zahăr, coloranţi, tanin, rezine etc.), în timp ce enzimele hidrolitice degradează hidrocarbonatele şi proteinele din bob, produşii hidrosolubili rezultaţi (zahăr, peptide, aminoacizi) trecînd în soluţie. Cînd amidonul este integral zaharificat, produsul este filtrat pentru îndepărtarea borhotului, iar mediului steril i se adaugă 200—300 g/hl hamei *(Humulus lupulus).* Hameiul introduce în must *lupulina,* un complex de substanţe secretate la baza bracteelor inflorescenţei femele sau a conurilor, care dau berei gustul amar caracteristic, aroma specială şi o uşoară putere antiseptică. După fierbere timp de 2½ ore, care asigură sterilizarea, stabilizarea şi clarificarea lichidului (prin dizolvarea rezinelor şi a taninurilor ca şi prin precipitarea proteinelor în urma combinării lor cu taninurile), mustul răcit brusc este gata pentru fermentaţie.

Fermentaţia începe după însămînţarea mustului cu o tulpină de *S. cerevisiae* sau *S. carlsbergensis* cu caractere de drojdie de fermentaţie inferioară (de fund), activă la temperaturi joase, şi capabilă să fermenteze complet rafinoza, spre deosebire de drojdiile din fermentaţie superioară care o fermentează numai parţial. Faza iniţială a fermentaţiei, *faza principală,* are loc în bazine deschise, în prezenţa aerului, la temperatura de 6—12°C şi durează 6—10 zile. În cursul ei, levurile utilizează substanţele din mediu pentru creştere şi transformă în alcool şi CO_2 o parte din maltoza dizolvată în must, menajînd dextrinele. Faza a doua a fermentaţiei, *faza secundară,* se realizează în atmosferă de CO_2, după decantare în vase închise, la temperatura de 1—3°C. Levurile care rămîn după decantare se recuperează, fiind folosite pentru însămînţarea unui alt lot de must, pentru extragerea de vitamine sau pentru prepararea unor medii de cultură (autolizat de drojdie). Numai foarte puţine celule de drojdie trec în produsul care va fermenta lent, în continuare, timp de 2—6 luni, în tancurile de fermentaţie. În această ultimă fază, producerea de alcool este foarte slabă, în schimb au loc unele modificări foarte avantajoase, ca: saturarea cu CO_2 care rămîne dizolvat în cantitate mare, ameliorarea calităţilor de gust şi aromă, limpezirea prin sedimentarea resturilor de drojdie, a substanţelor proteice inso-

lubile, a rășinilor etc. Înainte de comercializare, berea este limpezită în plus prin filtrare, la nevoie este îmbogățită artificial în CO_2 și, în unele fabrici, chiar pasteurizată [1].

d. Utilizarea microorganismelor în industria panificației

Încă din antichitate se observase că aluatul devine mai poros și își mărește volumul dacă la făină se adaugă suc de struguri în curs de fermentație sau o bucată de aluat vechi.

Această modificare este datorată unor microorganisme din categoria levurilor, care au proprietatea de a determina prin acțiunea zimazelor lor o fermentație a zahărului din făină, cu formare de alcool și liberarea unor cantități mari de CO_2 care tind să se degaje. Ca urmare, aluatul devine bine afînat, este „crescut" (are un volum mai mare). Pîinea „crescută" are miezul elastic, cu pori deși și uniformi; ea este ușor de asimilat și ameliorată ca gust și aromă, datorită produșilor secundari rezultați din fermentație.

Înaintea fermentației alcoolice produse de levuri, în aluat începe o fermentație lactică sub acțiunea bacteriilor lactice, care formează acid lactic prin decompunerea zahărului.

Fermentația lactică nu are rol direct în panificație, dar este deosebit de importantă deoarece, pe de o parte, creează condiții de *p*H favorabile pentru dezvoltarea levurilor, iar pe de altă parte, împiedică multiplicarea microorganismelor dăunătoare care ar putea altera gustul și aroma pîinii și ar putea intra în competiție cu levurile. În același timp, fermentația lactică influențează gustul pîinii și provoacă umflarea glutenului sub acțiunea CO_2 degajat, care este reținut astfel în porii aluatului.

Dospirea pîinii se poate face cu drojdii „sălbatice", provenite originar din făină, păstrîndu-se aluatul (maiaua) de la o zi la alta. În întreprinderile de panificație, ea se face cu drojdii selecționate, păstrate sub formă de drojdie comprimată numită impropriu „drojdie de bere".

Activitatea microorganismelor intervine în diferitele faze de fabricație a pîinii, după cum urmează:

1) În prima fază — *prepararea aluatului* — se face o maia subțire, amestecînd o parte din făină cu apă și cu toată cantitatea de drojdie. Maiaua se lasă în repaus cîtva timp în vederea înmulțirii drojdiilor și a bacteriilor lactice, după care i se adaugă restul de făină și de apă și se frămîntă. În cursul acestei faze, principalele proteine din făină, gliadina și glutenina, formează în prezența apei o masă legată, elastică, numită gluten, iar frămîntarea asigură omogenizarea și aerarea aluatului, ceea ce favorizează dezvoltarea în continuare a levurilor.

2) În cursul fazei următoare — *dospirea aluatului (fermentație)* — care are loc la temperatura de aproximativ 30°C, enzimele amilolitice din făină

[1] Ca și vinul, berea poate suferi alterări microbiene ca tulburare (*S. turbidans*, *S. pastorianus*, *S. cerevisiae paraellipsoideus*, *Candida mycoderma* etc.), acrire (*Acetobacter*), miros neplăcut, vîscozitate, gust rînced (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Pediococcus* etc.).

hidrolizează o parte din amidon la maltoză, care, sub acţiunea maltazei, este apoi descompusă în glucoză, din care, în continuare, sub acţiunea zimazei, rezultă alcool şi CO_2.

Paralel, continuă şi fermentaţia lactică, începută imediat înaintea celei alcoolice. În cursul fermentaţiei lactice, sub acţiunea CO_2 care se degajă, glutenul, care este elastic, se umflă şi astfel pîinea „creşte" şi devine poroasă.

3) În *faza iniţială a coacerii*, procesele microbiene continuă, deoarece la temperatura de 45—50°C drojdiile au încă o activitate intensă prin care produc o fermentaţie rapidă, însoţită de creşterea aluatului. Dincolo de 50°C drojdiile mor, însă activitatea enzimelor amilolitice continuă pînă la 80°C, cu degajare de CO_2, ceea ce măreşte porozitatea pîinii.

În cursul acestor procese, în pîine apar unii produşi chimici noi, ca diacetilul, care îi dau aroma plăcută.

Modificările biochimice din cursul panificaţiei au fost studiate de Kent-Jones (1950), care a arătat că în procesele de fermentaţie sînt utilizate şi degradate de drojdii în primul rînd zaharurile libere — glucoza, fructoza, melibioza şi maltoza — prezente în făină, în timp ce enzimele diastatice din făină acţionează asupra amidonului, mărind cantitatea de zahăr fermentescibil. Cea mai mare parte din alcoolul format se elimină în timpul coptului, în timp ce CO_2 este aproape în întregime reţinut datorită modificărilor de structură fizico-chimică ale aluatului (Kent-Jones, 1950) [1].

c. Prepararea glicerinei pe cale fermentativă

Glicerina este produsă obişnuit prin *metode chimice* din grăsime şi din uleiuri vegetale, ca şi prin recuperarea din leşiile rămase de la fabricarea săpunurilor. În perioadele în care acest tip de materie primă se găseşte mai greu, în ţările lipsite de petrol şi în cazul unor disponibilităţi mari de melasă, glicerina poate fi produsă şi pe *cale fermentativă*, cu un randament destul de mare.

În cercetările sale asupra fermentaţiei alcoolice Pasteur a arătat că drojdia formează 2,5—3,6% glicerol, raportat la greutatea zahărului consumat (4—6 părţi glicerol la 100 părţi alcool etilic).

Neuberg a demonstrat că mersul fermentaţiei poate fi deviat de la calea normală (calea *I* de fermentaţie a lui Neuberg, prin care se produce mult alcool etilic şi puţin glicerol), prin adăugarea de sulfit de sodiu ($NaHSO_3$) şi utilizarea unei tulpini de drojdie adaptată la mediul alcalin (*S. ellipsoideus* var. *Steinberg*), în care caz cantitatea de glicerol creşte la 10% faţă de zahărul consumat. Reacţia decurge astfel:

$$\text{glucoză} + SO_3^{=} \rightarrow \text{glicerol} + \text{acetaldehidă} \cdot SO_3^{-} + CO_2$$

(calea a *II*-a de fermentaţie a lui Neuberg).

[1] În condiţii necorespunzătoare de păstrare, pîinea şi alte produse de panificaţie suferă procese de alterare determinate de microorganisme care pot produce modificări de gust şi miros, de consistenţă sau de culoare. Astfel, *Penicillium glaucum*, *Aspergillus* sp. produc mucegăirea, iar *Oidium aurantiacum* etc. provoacă apariţia de pete roşii-portocalii. Din aceste cauze pîinea devine neconsumabilă.

În procedeele industriale mai noi, randamentul poate fi crescut la 30%, utilizîndu-se pentru alcalinizare adăugarea periodică sau continuă de CO_3Na_2 la lichidul de fermentație și folosindu-se o tulpină de *Zygosaccharomyces acidifaciens*, care produce mari cantități de glicerină prin fermentație normală, după reacția:
2 glucoză → 2 glicerol + acetat + + etanol + 2 CO_2 (calea a *III*-a de fermentație a lui Neuberg).

Glicerina are numeroase aplicații practice, ca solvent și adeziv, în industria chimico-farmaceutică, a cauciucului sintetic, a nitroglicerinei etc.

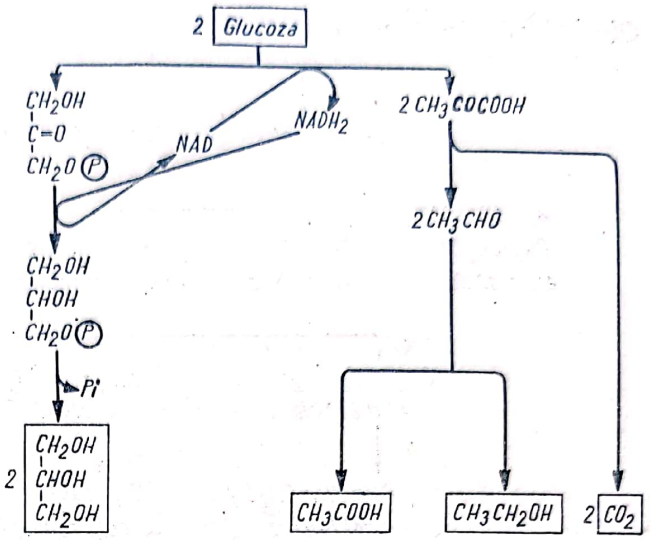


Fig. 446. Căile de formare a glicerinei pe cale fermentativă sub acțiunea levurilor (calea a 3-a de fermentație a lui Neuberg).

2. ALTE FERMENTAȚII UTILIZATE ÎN INDUSTRIE

Unele bacterii strîns înrudite sistematic au proprietatea de a produce fermentații care diferă una de alta după natura și cantitatea produșilor finali și după condițiile necesare pentru desfășurarea procesului fermentativ. Asemenea bacterii produc fermentațiile *acetono-etilică, acetono-butilică* și *butanol-izopropilică.*

Fermentația acetono-etilică este produsă de *Bacillus acetoaetylicus* care degradează polizaharidele din materii prime ca melasă, cereale, cartofi, cu formare de acetonă și alcool etilic. Procesul durează 5—6 zile la temperatura de 40—43° și decurge după reacția probabilă:

$$\underset{\text{amidon}}{2\,C_6H_{10}O_5} + 3\,H_2O \rightarrow \underset{\text{alcool etilic}}{2\,CH_3{-}CH_2OH} + \underset{\text{acetonă}}{CH_3COCH_3} + 5\,CO_2 + 4\,H_2$$

Fermentația acetono-butilică are loc sub acțiunea bacteriei *Clostridium acetobutylicum,* care are proprietatea de a degrada hidrocarbonatele cu formare de acetonă, alcool butilic și alcool etilic după schema din figura 447.

Materia primă este reprezentată în special de porumb, orez și cartofi, amidon solubilizat, melase etc.

Randamentul fermentației este deosebit de mare, fiind apreciat, după Fedorov, la circa 541 l alcool butilic și 320 l acetonă în 42 de ore pentru 3 000 kg materie primă (orez).

Realizată pe scară industrială, această fermentație are o deosebită importanță practică, datorită utilității largi a produselor obținute. Acetona este folosită în industria chimică, în medicină și la fabricarea explozivelor, iar alcoolul butilic, folosit curent ca dizolvant în industria lacurilor și a vopselelor, este

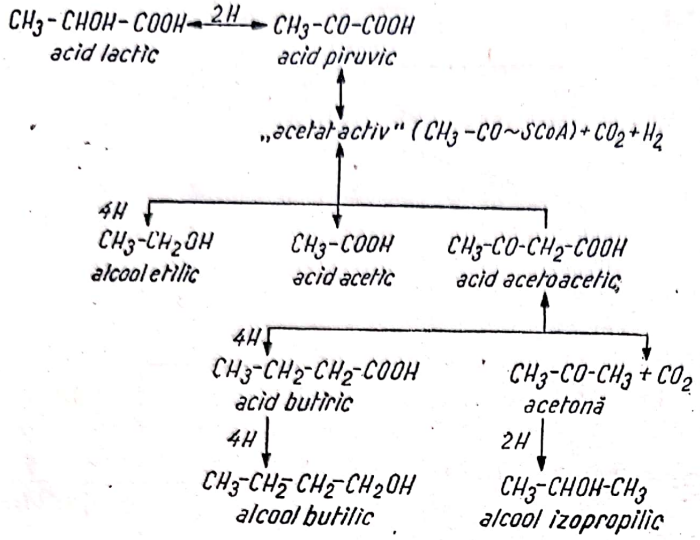


Fig. 447. Formarea alcoolului butilic şi a acetonei sub acţiunea bacteriei *Clostridium acetobutylicum* (după Kluyver Van Niel).

în acelaşi timp materia primă din care se obţine butadienul ($CH_2=CH—CH=CH_2$), cu care se prepară cauciucul sintetic.

Fermentaţia butanol-izopropilică este realizată de bacteria sporulată anaerobă *Clostridium butylicum* (sin. *Granulobacter butylicum*), care formează alcool butilic şi alcool izopropilic

($CH_3—CHOH—CH_3$).

Acesta din urmă este folosit ca solvent sau ca înlocuitor al acetonei şi alcoolului etilic în unele industrii.

3. FERMENTAŢIA ACETICĂ

Acest proces de fapt impropriu numit fermentaţie, deoarece *acidul acetic* se obţine în aerobioză, prin oxidarea alcoolului în prezenţa O_2 gazos de către bacterii aparţinînd genului *Acetobacter*.

Deşi oţetul este cunoscut din cele mai vechi timpuri, abia în anul 1837 Kützing emite ipoteza că transformarea alcoolului în acid acetic este produsă de microorganisme. Ulterior în perioada 1864—68, Pasteur confirmă această ipoteză şi descrie microorganismul *Mycoderma aceti*.

Dezvoltarea spontană a bacteriilor acetice în timpul păstrării unor produse alcoolizate (vin, bere) este dăunătoare, deoarece produce oţetirea băuturilor. Pentru prepararea industrială a acidului acetic se folosesc însă culturi de bacterii selecţionate care pot produce pînă la 10% acid acetic, garantînd o calitate superioară a produsului.

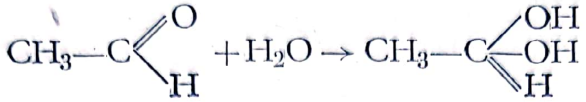
Bacteriile acetice sînt microorganisme aerobe, aparţinînd genului *Acetobacter*, care cresc la suprafaţa mediilor nutritive alcoolizate, formînd o peliculă bacteriană groasă.

Dintre numeroasele specii existente (*Acetobacter aceti, A. pasteurianus, A. kützingianus, A. xylinum, A. oxydans, A. suboxydans, B. xylinoides, A. vini aceti, A. acetigenum, A. orleanense, A. schuetzenbachii*), numai ultimele trei pot fi folosite în producţie.

Reacţia probabilă de transformare a alcoolului în acid acetic constă în dehidrogenarea alcoolului cu forme de acetaldehidă (*1*) astfel:

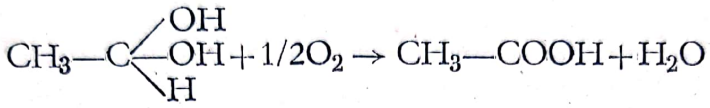
$$\underset{\text{etanol}}{CH_3—CH_2OH} + 1/2O_2 \rightarrow \underset{\text{acetaldehidă}}{CH_3—C\begin{matrix}\diagup O \\ \diagdown H\end{matrix}} + H_2O \qquad (1)$$

Acetaldehida fixează o moleculă de apă, formînd hidrat de acetaldehidă (*2*), care prin dehidrogenare dă acid acetic (*3*):



(*2*)

acetaldehidă hidrat de acetaldehidă



(*3*)

hidrat de acetaldehidă acid acetic

În afară de aceasta, în oţetul produs pe cale naturală mai apar urme de diferiţi esteri, ca acetatul de etil, şi cantităţi mai mici de alcool, glicerină, uleiuri volatile etc., care îi dau aroma plăcută.

Materia primă folosită în producţie este reprezentată de orice produs alcoolic sau capabil să dea prin fermentaţie alcool, care ulterior este supus fermentaţiei acetice. Se folosesc deci şi vinuri, în special alterate şi nu prea alcoolizate, alcooluri obţinute din cereale, sfeclă sau cartofi, rafinate şi diluate 10—12%, bere, sucuri de fructe, siropuri de zahăr, materiale amidonoase hidrolizate etc. Calitatea produsului final obţinut depinde de compoziţia materiei prime utilizate. Temperatura este cuprinsă între 20 şi 32°, cu menţiunea că la 30° acidifierea este mai rapidă, în timp ce la temperaturi mai joase fermentaţia este mai lentă, dar produsul final este superior.

Metoda prin care se obţine oţetul de cea mai bună calitate este *metoda franceză*, numită şi *metoda lentă* sau *orleaneză* (după oraşul Orléans), în care se foloseşte ca materie primă un amestec de vin şi oţet (2% acid acetic, 4% alcool).

În acest scop, în butoaie de aproximativ 200 de litri se pun cam 1/3 din volum oţet de bună calitate şi 10—15 litri de vin, după care la fiecare 7 zile, timp de 4 săptămîni, se adaugă din nou cîte 10—15 l vin. Deoarece însămînţarea lichidului se face cu bacterii acetice din aer, adaosul de oţet are ca scop să împiedice, prin creşterea acidităţii mediului, dezvoltarea microflorei banale asociate.

Producerea de acid acetic se face lent, timp de cîteva săptămîni, deoarece bacteriile care formează un văl, vin în contact cu O_2 numai la suprafaţa lichidului, în timp ce microorganismele din straturile inferioare primesc puţin O_2 şi acţionează mult mai slab. Mersul lent al fermentaţiei face producţia mai costisitoare, dar permite formarea de substanţe aromatice care dau oţetului un „buchet" aparte.

După 5—6 săptămîni, cînd se ajunge la o concentraţie de 5—6% acid acetic, se recoltează 10—15 litri de oţet şi se adaugă o cantitate egală de vin, după care procesul se reia de la început, putînd fi repetat.

Metoda germană (rapidă) folosește un amestec lichid, format din alcool etilic 3% și oțet 6% cu adaos de substanțe nutritive pentru bacterii, care este introdus în butoaie de lemn. Pentru a se crea o suprafață cît mai mare de contact între bacterii și mediu, necesară pentru oxidarea alcoolului, vasele sînt umplute cu talaș fin de lemn de fag la care se adaugă bacterii acetice selecționate — *Acetobacter orleanense, A. schuetzenbachii, A. acetigenum* — asigurîndu-se tot timpul circulația permanentă a unui curent de aer.

Amestecul alcool-acid acetic este turnat prin partea superioară a vasului și filtrează prin stratul de talaș, unde lichidul alcoolizat fin divizat în picături, etalat pe o suprafață mare și bogat oxigenat, suferă un proces de oxidare, în așa fel încît în partea inferioară se poate colecta lichid bogat în acid acetic (9%) și aproape lipsit de alcool. Pentru ca oxidarea să fie completă, același lichid este trecut de trei ori prin stratul de talaș.

Prin reglarea corectă a ritmului de funcționare, vasul o dată pus în funcțiune poate fi reîncărcat cu lichid, asigurîndu-se în continuare producția de acid acetic timp de mai mulți ani. Pentru prepararea oțetului comercial, acidul acetic astfel obținut este diluat pînă la concentrația de 4,5%.

După preparare, indiferent de metodă, produsul este clarificat prin decantare și păstrat la 10—15°C în butoaie pline, unde suferă o oxidare lentă, care îi ameliorează calitatea.

4. FERMENTAȚIA LACTICĂ

Cunoscută empiric încă din antichitate fermentația lactică este un proces biologic care a fost explicat științific de Pasteur, o dată cu descoperirea sa privitoare la bacteriile lactice și rolul lor în natură. Produsul ei, acidul lactic, are numeroase aplicații practice în industria alimentară (acidifiant al sucurilor și esențelor de fructe, al limonadelor), în medicină, în industria chimică (mordant la colorarea și imprimarea mătasei și a diferitelor textile), în industria pielăriei etc.

După căile de degradare a substratului și natura produșilor finali rezultați din fermentație, bacteriile lactice pot fi împărțite în două grupuri: *1) bacteriile din grupul homofermentativ*, care fermentează hexozele prin ciclul glicolizei (analog aceluia din mușchi) și formează ca produs principal de fermentație acidul lactic și numai urme de acizi volatili, alcool etilic, acid fumaric și CO_2; din această categorie fac parte *Lactobacillus casei, L. plantarum, L. delbrueckii, L. lactis, L. caucasicus, L. cremoris, L. acidophilus, L. helveticus, L. bulgaricus, L. bifidus* ca și *Streptococcus lactis, S. cremoris, S. thermophilus; 2) bacteriile din grupul heterofermentativ*, care fermentează hexozele prin ciclul pentozo-fosfatului, producînd acid lactic, etanol, CO_2, acid acetic, glicerină și manitol, care apar în proporții variabile după natura materiei prime, condițiile de fermentație și microorganismul producător; din acest grup fac parte *Lactobacillus brevis, L. lycopersici, L. pentoaceticus, Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, L. citrovorum.*

Materia primă supusă fermentației poate fi reprezentată de substanțe amidonoase (cartof și porumb), zaharoase (melasă), zerul rezultat de la fabricarea

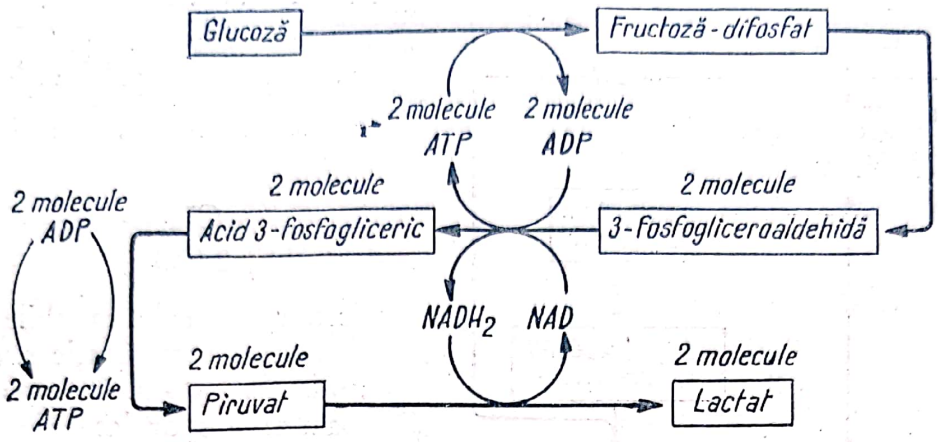


Fig. 448. Fermentaţia homolactică a glucozei: $NADH_2$ produs în timpul formării piruvatului este oxidat, pentru a reduce piruvatul la lactat; în prezenţa O_2 însă, $NADH_2$ este oxidat pe calea lanţului respirator, fără producere de lactat.

brînzeturilor, leşii sulfitice etc. În cazul utilizării substratului pe bază de amidon, este necesară tratarea lui prealabilă cu malţ care transformă polizaharidul într-un material fermentescibil — plămada dulce — care conţine maltoză. După încălzire la 80°C pentru omorîrea microflorei asociate, materia primă — la care s-a adăugat şi praf fin de cretă — este transportată în fermentatoare cu temperatura de 45—50°C şi este însămînţată cu o cultură selecţionată de *L. delbrueckii* (pentru amidon, glucoză, melase), *L. bulgaricus* (pentru zer) sau *L. plantarum* (pentru leşii sulfitice). Fermentaţia durează 8—10 zile, interval în care 90—98% din zahărul fermentat este transformat în acid lactic.

Fermentaţia *homolactică* se desfăşoară după un mecanism similar aceluia al fermentaţiei alcoolice, cu deosebirea că acidul piruvic produs pe calea Embden-Meyerhof-Parnas este redus la acid lactic în loc să fie decarboxilat şi redus la etanol. Reacţia este catalizată de lacticdehidrogenază. Pentru a se asigura utilizarea eficientă a substratului şi multiplicarea intensă a bacteriilor, pe măsură ce se formează acid lactic, el este neutralizat cu hidroxid de calciu, astfel încît produsul final este lactatul de calciu. Dacă acidul lactic nu ar fi neutralizat, fermentaţia s-ar opri, deoarece bacteriile nu suportă o aciditate foarte pronunţată. Acidul lactic este separat din lactat, prin adăugare de H_2SO_4 care precipită Ca sub formă de $CaSO_4$. Soluţia de acid lactic obţinută prin fermentaţie este concentrată la 50—80% acid lactic prin evaporare în vid şi este folosită ca atare sau după o purificare prealabilă.

Aplicaţii practice ale fermentaţiei lactice. În afară de producţia de acid lactic, fermentaţia lactică mai are numeroase alte aplicaţii practice: la prepararea laptelui acru, a iaurtului şi a altor produse lactate, la conservarea şi la însilozarea nutreţului.

5. FERMENTAŢIA BUTIRICĂ

Fermentaţia butirică reprezintă degradarea zaharurilor simple, a polizaharidelor şi a polialcoolilor sub acţiunea microorganismelor, cu formare de acid

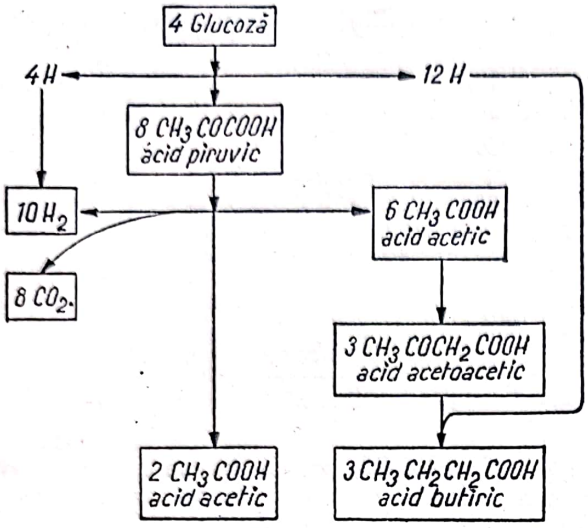


Fig. 449. Fermentaţia butirică a glucozei sub acţiunea bacteriei *Clostridium butyricum*.

butiric şi diferiţi produşi secundari (acid acetic, acid propionic, acid capronic, alcooli etilic şi butilic etc.).

Schema generală a acestei fermentaţii este:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3—CH_2—CH_2—COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 + 18 \text{ cal.}$$

Microorganismele capabile să realizeze această fermentaţie sînt foarte răspîndite în natură. Cele mai active sînt bacteriile sporulate anaerobe — *Clostridium butyricum, Granulobacter pectinovorum, B. saccharobutyricum, B. lactobutyricum, Clostridium dasteurianum, B. polymyxa* ş.a.

Pentru producerea industrială a acidului butinic se foloseşte ca materie primă orice produs vegetal (cartof, cereale), reziduurile de la fabricarea amidonului şi a zahărului etc. După ce plămada este îmbogăţită cu N şi zaharificată cu H_2SO_4 diluat (care hidrolizează polizaharidele în zaharuri simple), i se adaugă o cultură selecţionată de bacterii butinice. Fermentaţia durează, în general, trei zile, după care produsul rezultat este supus unei distilări fracţionate pentru separarea diferitelor produse rezultate din fermentaţie, a căror proporţie depinde de compoziţia chimică a plămezii şi de microorganismele folosite.

O dată purificat, acidul butiric este esterificat, iar esterii săi sînt folosiţi în industria alimentară (dulciuri, sucuri, limonade etc.), datorită mirosului lor plăcut de fructe (esterul etilic are miros de pară, cel metilic miros de măr).

Fermentaţia butirică naturală a produselor alimentare este foarte păgubitoare, deoarece alterează alimentele. Gustul amar şi rînced al untului alterat este datorat acidului butiric liber format în urma degradării gliceridelor, ca şi gustul amar şi mirosul neplăcut al laptelui acru care a suferit o fermentaţie butirică în locul celei lactice.

Acidul butiric rezultă şi din diferite alte fermentaţii, ca, de exemplu, fermentaţia acidului lactic şi a celulozei, topitul plantelor textile, precum şi din procesele de putrefacţie.

6. TOPITUL BIOLOGIC AL PLANTELOR TEXTILE

Mecanismul biologic al topitului plantelor textile, procedeu practicat încă din antichitate de egipteni care foloseau apele Nilului şi bălţile rămase după revărsări, a fost ignorat pînă în perioada pasteuriană, cînd, prin analogie cu diferitele fermentaţii, s-a presupus pentru explicarea lui intervenţia unor microorganisme. În perioada 1856—1895 au fost izolate microorganismele specifice şi s-a studiat dinamica proceselor biologice implicate în acest pro-

cedeu tehnologic, practicat şi astăzi, cu excepţia topitoriilor moderne, în mod empiric.

În natură, degradarea biologică a substanţelor pectice are o importanţă foarte mare, deoarece dezagregarea ţesuturilor vegetale nelignificate (de exemplu, a frunzelor care cad toamna) favorizează procesele de mineralizare a substanţelor organice din constituţia acestora, oferind bacteriilor celulozolitice o mai mare suprafaţă de atac.

Pectinele sînt substanţe din grupul poliuronidelor, prezente la toate fanerogamele, la care intră în constituţia lamelei mijlocii a membranei celulare. Ele au rolul de a cimenta celulele şi ţesuturile vegetale. Conţinute practic în toate resturile vegetale în proporţie de 10—30%, ele sînt în special abundente în fructe, din ale căror extracte rezultă prin răcire gelatine (*pectis* — gelatină).

Degradarea biologică a pectinelor în condiţii controlate („topire") este folosită în practică pentru separarea fasciculelor de fibre liberiene din ţesuturile plantelor textile. În timpul topirii, substanţele pectice cimentante se descompun, pe cînd celuloza din fibrele liberiene rămîne nemodificată, distrugîndu-se astfel numai legătura dintre fasciculele de fibre liberiene şi ţesuturile înconjurătoare (epidermă şi lemn). Dacă procesul de degradare nu este oprit la timp, el determină şi dezagregarea fasciculelor de fibre (supratopire).

Topitul plantelor textile se poate face, după caz, în aerobioză sau anaerobioză, la rîu (în apa curgătoare) sau în bazine special amenajate, în care se pot controla temperatura şi alţi factori.

Fazele procesului de topire controlată:

1) *Faza fizică* începe o dată cu introducerea tulpinilor de in, cînepă, chenaf etc. în apă. Proporţia dintre plante şi apă trebuie să fie de cel puţin 1 : 20 pentru a împiedica efectul dăunător al acizilor care rezultă din acţiunea microorganismelor în etapele următoare.

În această fază se produce distrugerea mecanică parţială a tulpinilor care se îmbibă cu apă, se umflă şi încep să prezinte crăpături care uşurează pătrunderea microorganismelor în ţesuturi. În acelaşi timp, în afară de aer trec în mediu şi diferite substanţe organice (glucide, proteine, tanin, substanţe colorate) şi minerale, care transformă apa într-un mediu nutritiv pentru microorganisme, aflate iniţial în număr mic şi practic inactive.

2) *Faza biologică preliminară* (premergătoare topirii) corespunde perioadei în care o microfloră aerobă extrem de variată se multiplică pe seama substanţelor extrase din tulpini, degajînd cantităţi mari de gaze (CO_2, H_2), care formează o spumă la suprafaţa lichidului.

Această microfloră „însoţitoare" este reprezentată de germeni proveniţi din aer, sol, apă şi de pe tulpini şi este variabilă de la un topit la altul.

În bazinele în care se topeşte repetat, ea se poate stabiliza într-o anumită măsură. De obicei, această microfloră este reprezentată de *B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Oidium lactis*, *Torula* sp., *Chladosporium herbarum*, bacterii denitrificatoare etc.

Activitatea acestor microorganisme încetează la un moment dat, datorită acumulării de acizi formic, lactic, butiric etc. (*p*H 4,6—5,6), care le creează condiţii de viaţă improprii.

Scanned with OKEN Scanner

La sfîrşitul fazei, degajarea de gaze încetează, ca şi fermentaţia substanţelor extrase.

3) *Faza biologică principală* (pectinoliza) începe la jumătatea celei de-a doua faze şi creşte treptat în intensitate. În cursul ei se produce degradarea substanţelor pectice cu degajare de gaze (se formează o mare cantitate de CO_2). Tulpinile sînt acoperite de mucozităţi, iar lichidul are un miros intens de acid butiric.

Această fază este determinată de acţiunea microorganismelor specifice — *pectinolitice* — prezente pe tulpinile supuse topitului. Ele se găsesc în sol sau pe resturile vegetale şi sînt antrenate de vînt şi ploi o dată cu praful. Dovada existenţei lor în natură o constituie topitul spontan al tulpinilor părăsite pe cîmp. În topitoriile moderne, procesul este stimulat prin adăugarea de culturi selecţionate.

Cele mai active sînt bacteriile pectinolitice a n a e r o be ca *Clostridium (Granulobacter) pectinovorum, B. amylobacter, Clostridium felsineum, Cl. haumani, Cl. roseum, Cl. pectinolyticum, B. polymyxa* etc. În aerobioză, topitul este produs de bacterii pectinolitice a e r o b e, ca: *B. vulgatus, B. mesentericus, B. subtilis, B. asterosporus.*

La sfîrşitul acestei faze, datorită epuizării pectinelor şi acumulării de acizi, activitatea microorganismelor pectinolitice încetează, iar locul lor este luat de microflora banală, mai tolerantă faţă de aciditate (*E. coli, B. fluorescens liquefaciens, B. fluorescens nonliquefaciens* etc.).

Topitul trebuie oprit la timp pentru a se obţine fascicule de fibre. În cazul în care plantele nu sînt scoase la timp din lichid, ele suferă procesul de supratopire în cursul căruia încep să se separe şi fibrele individuale ale fasciculelor, care sînt legate de pectine parţial lignificate, mai rezistente la acţiunea microorganismelor pectinolitice, dar care pot fi degradate de enzimele din lichidul de topit.

În ultima fază, ţesuturile topite sînt lăsate să se usuce, de preferinţă la aer, pentru ca microflora aerobă să oxideze acizii organici fixaţi de fibre, după care sînt trecute printr-un dispozitiv special (meliţă), care liberează fibrele de părţile lemnoase şi resturile corticale.

Durata fazelor biologice ale topitului este variabilă după temperatura şi activitatea pectinolitică a microorganismelor care îl produc.

Mecanismul biochimci al pectinolizei. Pectinele sînt constituite dintr-un număr mare (peste 1 000) de molecule de acid α-galacturonic grupate într-o macromoleculă liniară.

Hidroliza lor completă se realizează sub acţiunea unei enzime elaborată de microorganismele amintite — *pectinaza* — după reacţia:

$$\underset{\text{acid pectic}}{C_{46}H_{68}O_{40}} + 10H_2O \rightarrow \underset{\text{acid galacturonic}}{4CHO-(CHOH)_4-COOH} + \underset{\text{galactoză}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{arabinoză}}{C_5H_{10}O_5} +$$

$$+ \underset{\text{xiloză}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{acid acetic}}{2CH_3COOH} + \underset{\text{alcool metilic}}{2CH_3OH}$$

Dintre aceste produse, fermentează mai departe numai galactoza şi arabinoza, care sînt supuse unei fermentaţii butirice tipice cu formare de acid butiric, CO_2, H_2 şi H_2O, astfel:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3—CH_2—CH_2—COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 + x \text{ kcal} \quad (1)$$

$$C_5H_{10}O_5 \rightarrow CH_3—CH_2—CH_2—COOH + CO_2 + H_2O + x \text{ kcal} \quad (2)$$

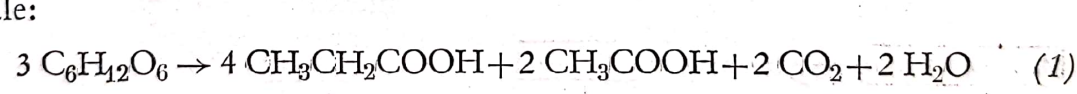
Topitul *aerob*, folosit rar, se face răspîndind tulpinile de in, cînepă etc., în strat subţire pe suprafaţa solului şi lăsîndu-le expuse influenţei condiţiilor naturale (rouă şi ploi). La nevoie, ele sînt întoarse periodic pentru a se asigura o topire uniformă. Procesul este mult mai greu de controlat şi este asociat cu prezenţa unui număr mare de bacterii din sol (*B. asterosporus, B. subtilis, B. mesentericus, B. vulgatus* etc.).

7. PRODUCEREA PE CALE BIOLOGICĂ A ALTOR ACIZI ORGANICI

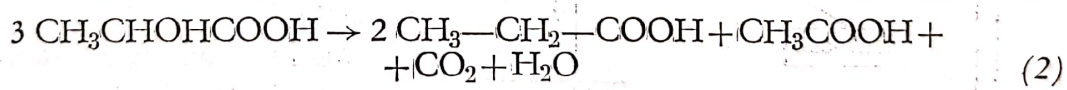
a. Producerea de acid propionic

Numeroase microorganisme produc cantităţi mici de acid propionic, ca produs final al dezasimilării glucidelor. Unele bacterii însă, ca *Propionibacterium freudenreichii, P. technicum* produc cantităţi importante din acest acid cînd sînt cultivate anaerob pe medii care conţin diferite zaharuri, extract de drojdie (sursă N) şi factori de creştere. Cele mai mari cantităţi de acid propionic sînt preparate pe cale de sinteză, folosind ca materie primă gazele naturale, sau prin oxidarea *n*-propanolului.

Procesele microbiene de fermentaţie propionică sînt importante în special pentru industria brînzeturilor fermentate şi maturate. Produşii finali ai fermentaţiei (acid propionic, acid acetic) dau un gust special brînzeturilor, iar CO_2 degajat contribuie la formarea unor „ochiuri" (găuri) uniform răspîndite în toată masa produsului. Fermentaţia are loc după următoarele ecuaţii generale:



$$3\,C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4\,CH_3CH_2COOH + 2\,CH_3COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2O \quad (1)$$



$$3\,CH_3CHOHCOOH \rightarrow 2\,CH_3—CH_2—COOH + CH_3COOH + CO_2 + H_2O \quad (2)$$

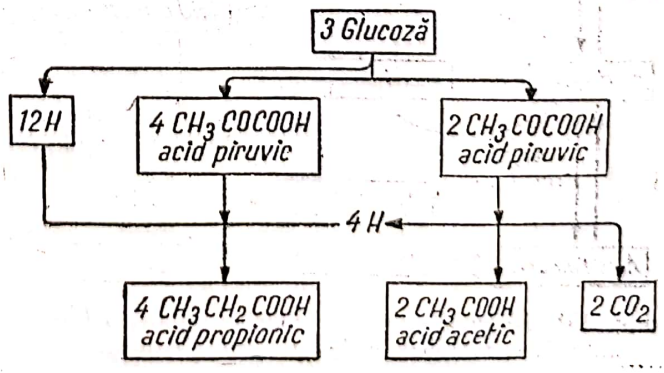


Fig. 450. Căile de formare ale acidului propionic sub acţiunea bacteriei *Propionibacterium freudenreichii*.

b. Producerea de acid gluconic

Acest produs este mai uşor de obţinut pe cale fermentativă decît prin oxidarea chimică (cu hipoclorit) sau electrolitică a glucozei.

Microorganismele utilizate curent în producţie sînt tulpini selecţionate de *Aspergillus niger*, deşi produsul poate fi obţinut şi sub acţiunea unor bacterii (*Acetobacter aceti*, *A. gluconicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. ovalis*) sau mucegaiuri (*Penicillium chrisogenum* ş.a.).

Materia primă este glucoza, a cărei metabolizare se realizează în culturi submerse aerate sub presiune. Oxidarea incompletă a glucozei sub acţiunea glucoz-oxidazei, elaborată de microorganismele din cultură asigură un randament mare de producţie (90—95% acid gluconic faţă de zahărul consumat), cu condiţia neutralizării acidului gluconic cu CO_3Ca sau NaOH.

$$\underset{\text{glucoză}}{CH_2OH(CHOH)_4CHO} + O + H_2O \rightarrow \underset{\text{acid gluconic}}{CH_2OH(CHOH)_4COOH} + H_2O$$

În raport cu natura substanţei care serveşte ca neutralizant, produsul final este gluconatul de Ca sau Na.

Acidul gluconic îşi găseşte cea mai importantă utilizare în industria farmaceutică, datorită faptului că Fe, Ca, K pot fi introduse în organism într-o formă netoxică şi uşor asimilabilă ca săruri ale acidului gluconic. El mai este folosit în industriile textilă şi de prelucrare a laptelui, precum şi la prepararea detergenţilor şi a produselor utilizate în fotografie.

c. Producerea de acid citric

Preparat iniţial prin extracţie din lămîi (care îl conţin în proporţie de 7—9%), acidul citric este astăzi obţinut în cea mai mare parte pe cale fermentativă, datorită capacităţii unor mucegaiuri de a produce acumularea lui abundentă în mediu.

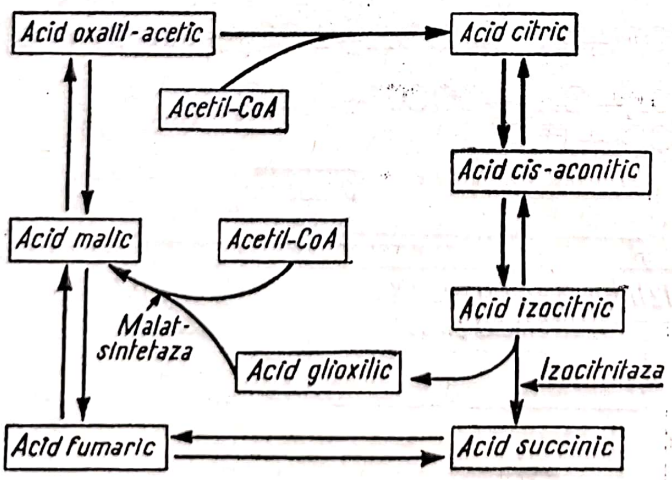


Fig. 451. Reprezentare schematică a căilor de biosinteză a acidului citric la *Aspergillus niger*.

Microorganismele întrebuinţate curent în acest scop sînt *Aspergillus niger* sau *Penicillium* sp., care folosesc surse necostisitoare de glucoză sau zaharoză. Acumularea maximă de acid citric (reprezentînd 50—85% din cantitatea de zahăr) se face într-un mediu deficient în fosfat, Fe, Mn, Zn şi probabil Cu. Dacă substratul supus fermentaţiei este glucoza, etapele procesului sînt urmă-

toarele: *glucoză* → *piruvat* → *acetat* + CO_2; *piruvat* + CO_2 → *malat* (sau oxalacetat); *malat* → *oxalacetat; oxalacetat* + *acetat* → *citrat.*

Absența unuia sau a mai multor elemente din mediu împiedică mucegaiul să metabolizeze tot acidul citric format, ceea ce duce la acumularea acestuia în mediu. Datorită calităților sale (toxicitate mică, gust plăcut, asimilare ușoară etc.), acidul citric este folosit pe scară largă în industriile farmaceutică și alimentară ca acidulant pentru diferite băuturi, ca atare sau sub formă de citrat de Na, drept conservant al dulceților și zaharurilor, ca antioxidant pentru prevenirea rîncezirii grăsimilor și uleiului, ca prezervant al gustului și culorii alimentelor înghețate. De asemenea, este folosit la prepararea coloranților, adezivilor și lacurilor, a cernelurilor etc.

Prin procedee similare pot fi obținuți și alți acizi organici ca *acidul aconitic* (cu *Aspergillus niger*), *acidul itaconic* (cu *A. itaconicus*), *acidul fumaric* (cu *Rhizopus nigricans*), *acidul oxalic* (cu *A. niger*).

d. Producerea de acid galic

În natură, acidul galic, sub formă de combinații esterice sau glicozidice, se găsește în concentrație mare mai ales în tanin, din care se poate obține pe cale chimică prin hidroliză cu acizi și saponificare cu baze sau, mai simplu, pe cale biologică prin așa-numita *fermentație galică a taninului.*

Taninul este un derivat al glucozei (penta-digaloil-glucoza), format prin esterificarea oxidrililor acesteia cu acid galic. El se găsește în cantități foarte mari în scoarța unor copaci ca salcia, stejarul tînăr și plopul, în ramura tînără de brad și mai ales în gale (gogoșile de ristic, care apar pe frunze și pe ramuri în jurul ouălor depuse de insecte prin înțepare). Unele gogoși de ristic (cele de stejar de China) pot conține tanin pînă la 67—77%.

Pentru prepararea acidului galic prin metoda microbiologică, substanțele cu tanin sînt extrase cu ajutorul apei calde din gogoșile măcinate, după care extractul este însămînțat cu spori ai unor tulpini selecționate de *Aspergillus niger.*

În condiții de aerare și agitație continuă, acest mucegai (și altele ca *Penicillium, Mucor* etc.) elaborează o enzimă — *tanaza* — care hidrolizează taninul, scindîndu-l în glucoză (care este consumată de mucegai) și acid digalic, care este, la rîndul său, hidrolizat la acid galic (acid 3,4,5 trihidroxibenzoic). Acidul galic se depune sub formă de cristale acioulare, din cauza slabei lui solubilități la temperatură scăzută. Procesul durează circa două săptămîni, în care aproximativ 98,7% din acidul galic existent este separat din tanin). După aceea, acidul galic este extras și purificat prin tratare cu un amestec de eter și alcool sau cu apă caldă, urmată de recristalizare.

Acidul galic este întrebuințat în industrie la prepararea culorilor de galocianină și ca substanță de bază la obținerea alizarinei.

e. Producerea aminoacizilor prin procese de fermentaţie

Utilizarea microorganismelor pentru producerea de aminoacizi are un avantaj însemnat faţă de aplicarea metodelor chimice de sinteză, deoarece ea asigură formarea exclusivă de *L*-aminoacizi biologic activi, care se găsesc în mod natural în organismele vii.

În prezent, procedeul este folosit curent pentru obţinerea pe cale industrială de acid *L*-glutamic, *L*-izoleucină, *L*-valină, *L*-lizină, extinderea lui la producerea altor aminoacizi avînd perspective sigure de a se realiza în viitor. Pentru exemplificare, vom prezenta obţinerea pe această cale a acidului glutamic.

Acidul glutamic. Folosit mult în industria alimentară sub formă de glutamat monosodic, substanţă cu rol de condiment care sporeşte aroma conservelor, acidul glutamic era preparat în trecut prin hidroliza a diferite proteine vegetale (gluten de grîu, soia şi porumb) sau a melaselor de sfeclă-de-zahăr etc. Procesele moderne de preparare se bazează fie pe sinteză chimică, fie pe fermentaţie. Prin sinteza chimică se obţine acid *D, L*-glutamic (forma racemică) din care cei doi izomeri optic activi sînt apoi separaţi pe cale enzimatică, folosindu-se enzime bacteriene sau fungice.

Producerea acestui aminoacid pe cale fermentativă se realizează cu ajutorul unei mutante auxotrofe a bacteriei *Micrococcus glutamicus*, izolată de Kinoshita (1958). Însămînţată într-un mediu de cultură simplu (glucoză, uree sau săruri de NH_4, substanţe minerale şi biotină), această tulpină bacteriană determină, prin activitatea ei metabolică în aerobioză puternică, o acumulare masivă de acid *L*-glutamic (pînă la 30 g/l mediu).

Randamentul producţiei depinde de conţinutul mediului în biotină, vitamină care acţionează nu numai ca factor de creştere, ci şi ca regulator al biosintezei, ca o substanţă cheie în determinarea tipului de metabolism al bacteriei.

Randamentul este maxim (peste 50 g glutamat pentru 100—150 g glucoză folosită), în prezenţa unui nivel optim de biotină (sub 5 γg/l). La concentraţii mai mici randamentul scade, datorită deficitului în factori de creştere, în timp ce sub acţiunea unor concentraţii mai mari de biotină, metabolismul este deviat spre formarea de acid lactic, ceea ce reduce acumularea în mediu a acidului glutamic.

8. BIOSINTEZA MICROBIANĂ A VITAMINELOR

Cercetările de microbiologie au contribuit foarte mult la lărgirea cunoştinţelor referitoare la vitamine. În primul rînd, o dată stabilită asemănarea strînsă dintre reacţiile metabolice de bază din celulele organismelor superioare şi cele care au loc în celulele microbiene, identificarea deficienţelor nutritive ale microorganismelor — exteriorizate prin necesitatea prezenţei obligatorii în mediul de cultură a anumitor substanţe indispensabile pentru creştere — a dus la descoperirea unor factori de creştere importanţi şi pentru metabolismul celulei animale, ca vitamina B_{12}, biotina, acidul folic, acidul pantotenic ş.a. Asemenea cercetări au fost favorizate de faptul că microorganismele se multiplică repede, iar curba lor de creştere poate fi studiată în condiţii uşor de controlat. Într-o

etapă următoare, capacitatea unor microorganisme de a face biosinteza unor vitamine în cursul metabolismului lor a fost folosită în practică pentru producția, inițial experimentală și apoi industrială, a mai multor vitamine.

Vitamina B_1 (tiamina sau aneurina) este produsă în cantități apreciabile de multe levuri cultivate în condiții de mediu corespunzătoare. Astfel, *Endomyces vernalis* poate să producă pînă la 7 U/ml. Se pare că, cel puțin în unele cazuri, nu ar fi vorba de biosinteza acestei vitamine, ci de concentrarea ei datorită proprietății levurilor de a fixa și acumula vitamina B_1 prezentă în componentele mediului de cultură (Prescott).

Vitamina B_2 (riboflavina) este un factor de creștere esențial pentru microorganismele care nu o pot sintetiza și care, de aceea, trebuie să o găsească în mediul de cultură ca atare. Cele mai multe microorganisme sînt însă capabile să o sintetizeze în cantități suficiente pentru nevoile lor metabolice, iar unele specii o produc chiar în exces față de nevoile imediate ale celulei și, ca urmare, o elimină în mediu. Astfel o serie de bacterii anaerobe din genul *Clostridium (Cl. acetobutylicum, Cl. felsineum, Cl. roseum)*, cultivate în industrie pe must de amidon de cereale îmbogățit cu diferite substanțe care favorizează creșterea, produc vitamina B_2 în cantități importante (50 mg/l mediu).

În afară de bacterii, mai sînt folosite curent în producție *Ashbya gossypii* (care produce vitamină B_2 în cantități atît de mari încît cristalizează în miceliu), *Eremothecium ashbyii* și *Candida guillermondia*.

Lichidele de cultură care conțin numai concentrații mici de vitamină, cum sînt cele provenite din fermentația acetonei și a butanolului, sînt de obicei uscate și utilizate în stare solidă ca supliment de hrană bogat în riboflavină. Mediile în care au fost cultivate *Ashbya* și *Eremothecium*, care conțin peste 1 000 μ g vitamină/ml, sînt folosite ca sursă de riboflavină cristalizată.

Vitamina B_{12}, extrasă din ficat în anul 1948 de Folkers și Smith, a fost identificată cu principiul activ în tratamentul anemiei pernicioase umane. Ulterior, s-a demonstrat identitatea totală dintre vitamina B_{12} cristalină izolată din ficat și cea provenită din mediile fermentate de anumite microorganisme.

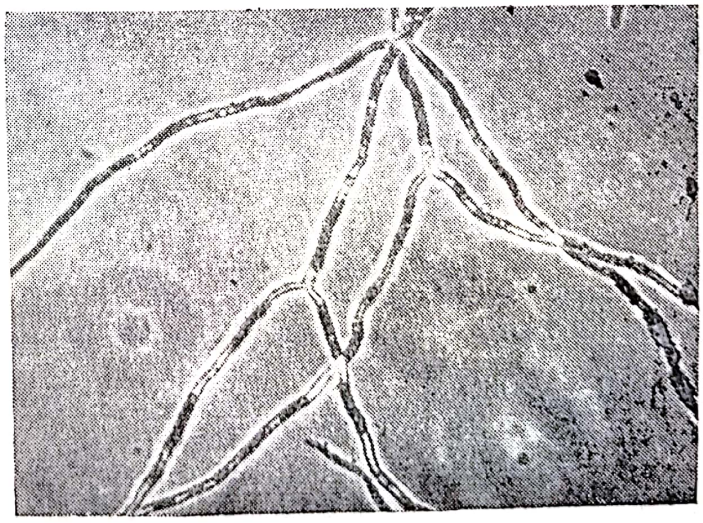


Fig. 452. *Eremothecium ashbii:* miceliu în curs de formare.

Datorită constituţiei sale chimice foarte complicate, vitamina B_{12} nu poate fi obţinută pe cale de sinteză. În ceea ce priveşte biosinteza acestei vitamine, aceasta nu poate fi realizată decît de bacterii. De aceea, ori de cîte ori prezenţa ei este asociată cu activitatea biologică a altor organisme, este totdeauna în cauză o contaminare bacteriană. Algele marine, care conţin cantităţi importante de vitamină B_{12}, nu fac decît să concentreze în structura lor vitamina din mediu sintetizată de bacterii. Cea mai bogată sursă de vitamină B_{12} este reprezentată de activitatea metabolică a microflorei din intestinul rumegătoarelor şi din cecul şi colonul ierbivorelor nerumegătoare.

Prima dovadă că vitamina B_{12} (numită mai tîrziu *cobamida*) poate fi obţinută prin fermentaţie a fost adusă de Stokstad (1948), care a arătat că bacteria *Flavobacterium solare* produce o substanţă activă în tratamentul anemiei pernicioase. Această proprietate a fost apoi pusă în evidenţă şi la alte bacterii şi actinomicete.

Iniţial, vitamina B_{12} era obţinută ca produs secundar la fabricarea unor antibiotice ca streptomicina, tetraciclina, neomicina etc. Ulterior, datorită nevoilor crescînde, au fost căutate şi găsite microorganisme, ca *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii* şi *Streptomyces olivaceus*, la care vitamina B_{12} este produsul major al fermentaţiei.

Cultivarea acestor bacterii se face într-un mediu — conţinînd glucoză 10%, N total (organic şi anorganic) 0,4%, extract de drojdie, hidrolizat de cazeină, săruri de cobalt etc., care a fost în prealabil supus unei „prefermentaţii" realizată de bacterii producătoare de acid lactic, factor stimulator al biosintezei ulterioare de cobamide (randamentul este de circa 25 μg/ml în 178 de ore, în condiţii obişnuite de cultură, şi de 213 μg/litru/oră, în condiţii de fermentaţie continuă).

Cea mai mare parte din vitamina B_{12} formată în timpul creşterii bacteriilor este reţinută în celule. De aceea, pentru eliberarea ei în mediu, masa celulară este tratată cu alcooli, cu acizi sau cu vibraţii sonice.

Vitamina C (acidul ascorbic) este obţinută pe cale industrială prin două procedee bazate pe oxidarea substratului cu ajutorul bacteriei *Acetobacter suboxydans*.

În *primul procedeu*, *D*-glucoza este transformată prin reducere electrolitică în *D*-sorbitol, care apoi este oxidat pe cale microbiană la *L*-sorboză. Etapele următoare implică tratarea cu acetonă şi formarea complexului diacetonă-*L*-*sorboză*, care este oxidat la acid 2-cetogulonic. Final, acesta este transformat prin enolizare în acid *L*-ascorbic sau vitamina C.

În cel de-*al doilea procedeu*, oxidarea bacteriană este folosită în două trepte, corespunzînd respectiv oxidării *D*-glucozei la acid 5 ceto-*D*-gluconic şi oxidării acidului *L*-idonic la acid *L*-2-ceto-gulonic.

În acest caz, în afară de *Acetobacter suboxydans* se mai folosesc şi alte specii de *Acetobacter*, precum şi bacterii din genurile *Aerobacter* şi *Pseudomonas* (Hori, Nakatani, Chain).

β-carotenul este o *provitamină* convertită de animale, la nivelul ficatului, în *vitamina A*. Produsă iniţial prin sinteză chimică sau prin izolare din ficat, această provitamină este preparată astăzi şi pe cale microbiologică, folosindu-se în special ciupercile *Blakeslea trispora* şi *Rhodotorula* sp.

Ergosterolul *(provitamina D_2)*. Sterolii sînt constituenți ai levurilor *(Saccharomyces cerevisiae, S. carlsbergensis)*, care îndeplinesc un rol important în asigurarea permeabilității membranelor celulare, în afară de faptul că reprezintă și un material de rezervă. Nevoia de steroli a levurilor este foarte evidentă în anaerobioză, adică în condițiile în care biosinteza acestor compuși nu este posibilă. Cel mai important, sub raport cantitativ, este ergosterolul (circa 80% dintre sterolii prezenți în celulă: la *Saccharomyces* sp., folosită pentru prepararea lui industrială, ergosterolul reprezintă 7—10% din greutatea uscată a celulelor).

Ergosterolul a fost izolat pentru prima dată din cornul secarei (ciuperca *Claviceps purpurea*) de Tanret (1879) care i-a și dat această denumire („ergot de seigle") (de la numele francez al cornului secarei) (Dulaney).

Sinteza sterolilor este corelată cu concentrația mediului în zahăr. La organismele pe cale de multiplicare, energia provenită din metabolismul glucidic, precum și produșii lui intermediari sînt utilizați rapid pentru sinteza de proteine și acizi nucleici. Cînd concentrația mediului în N începe să scadă, produșii intermediari ai metabolismului glucidic deveniți disponibili sînt folosiți la sinteza lipidelor și a sterolilor care au în celulă un precursor comun, acetatul.

Sinteza sterolilor continuă și după epuizarea glucidelor din mediu, pe seama rezervelor celulare și a etanolului acumulat în mediu. S-a demonstrat că există un adevărat antagonism între formarea proteinelor și aceea a lipidelor și sterolilor. Drojdiile bogate în proteine sînt sărace în steroli, iar condițiile de mediu care limitează sinteza proteinelor determină acumularea de celule bogate în steroli. În industrie se folosesc medii de cultură sărace în N asimilabil — ca melasa — care, datorită acestei caracteristici a compoziției lor, inhibă sinteza proteinelor celulare. Aerobioza mărește de aproximativ 10 ori acumularea de ergosterol. Prin iradiere cu U.V., ergosterolul se transformă în vitamină D_2

9. GIBERELINELE

Giberelinele formează un grup de substanțe cu o structură chimică complexă, conținînd nucleul tetracarbociclic *gibban*. Ele sînt produse specifice de metabolism ale mucegaiului *Gibberella fujikuroi* și se comportă ca *hormoni de creștere* a plantelor. Substanțe asemănătoare sînt produse în cantități mai mici și de unele plante superioare (în semințe necoapte de fasole, mazăre, în lupin, porumb, migdale și în lăstari, frunze, inflorescențe tinere de mazăre, rapiță etc.). Dintre principalele gibereline, acidul giberelic (*giberelina A_3* sau *giberelina X*) are cea mai mare activitate biologică. Descoperirea giberelinelor este legată de studiul unei boli a orezului (boala „*bakanae*"), observată în Japonia (Yabuta, 1935), în

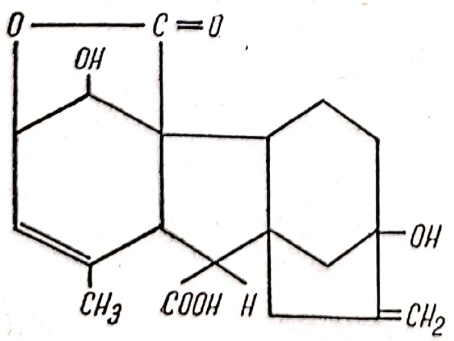


Fig. 453. Formula chimică generală a giberelinelor.

cursul căreia plantele tinere bolnave cresc rapid, neobişnuit de lungi şi palide, după care se veştejesc şi mor.

Boala poate fi reprodusă cu ajutorul filtratelor acelulare din culturi pe medii lichide, ale agentului patogen *Gibberella fujikuroi (Fusarium moniliforme)*. Tratarea plantulelor sănătoase cu aceste filtrate determină alungirea lor anormală. Efectul stimulator de creştere este datorat giberelinei, substanţă acidă, optic activă, incoloră şi se manifestă chiar la diluţii foarte mari (1/1 milion).

S-a demonstrat apoi că în realitate este vorba nu de o substanţă unică, ci de un grup de compuşi înrudiţi, liberaţi din mucegai (care şi este folosit în practică pentru producţia acestor substanţe), după faza de creştere activă a culturii concentraţia lor în mediu atingînd 22—180 mg/l.

Giberelinele stimulează creşterea plantelor în fazele în care acestea sînt sensibile la boli, favorizează germinarea seminţelor şi le scurtează perioada de postmaturaţie; ele accelerează creşterea plantelor care se dezvoltă lent, activează înflorirea şi fructificarea, măresc randamentul unor plante de cultură, proprietăţi pentru care s-a şi propus utilizarea lor în horticultură şi viticultură.

Principala lor aplicaţie este legată în prezent de accelerarea procesului de germinare a orzului, ceea ce are ca rezultat producerea unui malţ mai uniform şi cu activitate diastatică mărită.

10. ANTIBIOTICELE

Antibioticele sînt substanţe chimice de origine microbiană, care în soluţii diluate pot să inhibe creşterea bacteriilor şi a altor microorganisme sau chiar să le omoare (W a k s m a n).

După obţinerea penicilinei şi cloromicetinei pe cale de sinteză chimică, T r é f o u ë l a dat o definiţie mai largă antibioticelor pe care le caracterizează drept *substanţe chimice de origine biologică sau sintetică, apte să distrugă selectiv unele microorganisme sau să le împiedice multiplicarea*, permiţînd astfel fiinţelor superioare să lupte în mod eficace împotriva bolilor infecţioase.

Microorganismele producătoare de antibiotice — bacterii, actinomicete sau mucegaiuri — au fost în general izolate din natură şi păstrate în condiţii optime pentru a se asigura menţinerea calităţilor lor productive (tab. 31). Izolarea este în mod obişnuit laborioasă, ea necesitînd spre exemplu, în unele cazuri, cercetarea a aproximativ 100 probe de sol şi a circa 100 000 colonii (W a k s m a n). În prezent, se folosesc tulpini cu grad înalt de productivitate, obţinute prin selecţie în laborator dintre mutantele induse cu U.V. sau cu agenţi chimici.

Biosinteza substanţelor antibiotice de către microorganisme este un proces similar celui de formare al unor compuşi cu complexitate moleculară similară. Ea se realizează printr-o serie de reacţii, supraadăugate acelora din sistemele metabolice care asigură creşterea şi reproducerea celulară.

Fiecare microorganism producător, ca şi fiecare antibiotic, au caracteristici proprii şi, în consecinţă, tehnica de fabricare este adaptată acestor particularităţi.

TABELUL 31

ANTIBIOTICE DE ORIGINE BACTERIANĂ

Antibioticul		Microorganismul producător
Bacitracina		*Bacillus subtilis*
Gramicidina		*Bacillus brevis*
Polimixina		*Bacillus polymyxa*
Piocianaza		*Pseudomonas aeruginosa*
Bacteriocine	Colicina	*Escherichia coli*
	Megacina	*Bacillus megaterium*
	Piocina	*Pseudomonas aeruginosa*
	Pesticina	*Pasteurella pestis*
	Welchicina	*Welchia perfringens*
ANTIBIOTICE PRODUSE DE ACTINOMICETE		
Streptomicina		*Streptomyces griseus*
Aureociclina (Aureomicina-Clortetraciclina)		*S. aureofaciens*
Cloramfenicol (Cloromicetină-Clorocid)		*S. venezuelae*
Eritromicina		*S. eritreus*
Teramicina		*S. rimosus*
Rezistomicina		*S. resistomyceticus*
Negamicina (Neocilin-Neomicin)		*S. fradiae*
Novobiocina (Nivecin)		*S. niveus*
Stamicina (Micostatin-Nistatin)		*S. spheroides*
		S. noursei
ANTIBIOTICE DE ORIGINĂ FUNGICĂ		
Aspergilina		*Aspergillus niger*
Grizeofulvina		*Penicillium griseofulvum*
Penicilina		*Penicillium chrysogenum*
		Penicillium notatum

În cele ce urmează este descrisă sumar prepararea penicilinei cu menţiunea că, în linii mari, obţinerea celorlalte antibiotice se face după un procedeu similar, cu diferenţe care ţin de exigenţele metabolice (substanţe nutritive, O_2) ale organismului producător, de temperatură, *p*H etc., condiţii care pot varia de la un caz la altul.

Faza iniţială, aşa-zisă de fermentaţie, poate fi numită corect *faza biologică*, deoarece în cursul ei se asigură cultivarea în condiţii optime a microorganismului producător şi biosinteza antibioticului.

Cultivarea se face în profunzime în tancuri cilindrice de mare capacitate (circa 100 000 l), prevăzute cu dispozitive de aerare continuă cu aer steril, de agitare şi de reglare a temperaturii. Mediul de cultură conţine lactoză (sursă de O), făină de rapiţă sau de arahide (sursă de N), săruri minerale (sulfat de Na, sulfat de NH_4, carbonat de Ca, monofosfat de K etc.) şi extract apos de porumb („cornsteep") care exercită o acţiune favorabilă datorită conţinutului său în substanţe minerale, aminoacizi şi β-feniletilamină. La nevoie, se adaugă periodic, în condiţii sterile, o substanţă tensioactivă care stimulează dezvoltarea mucegaiului prin dispersarea culturii şi mărirea pe această cale a

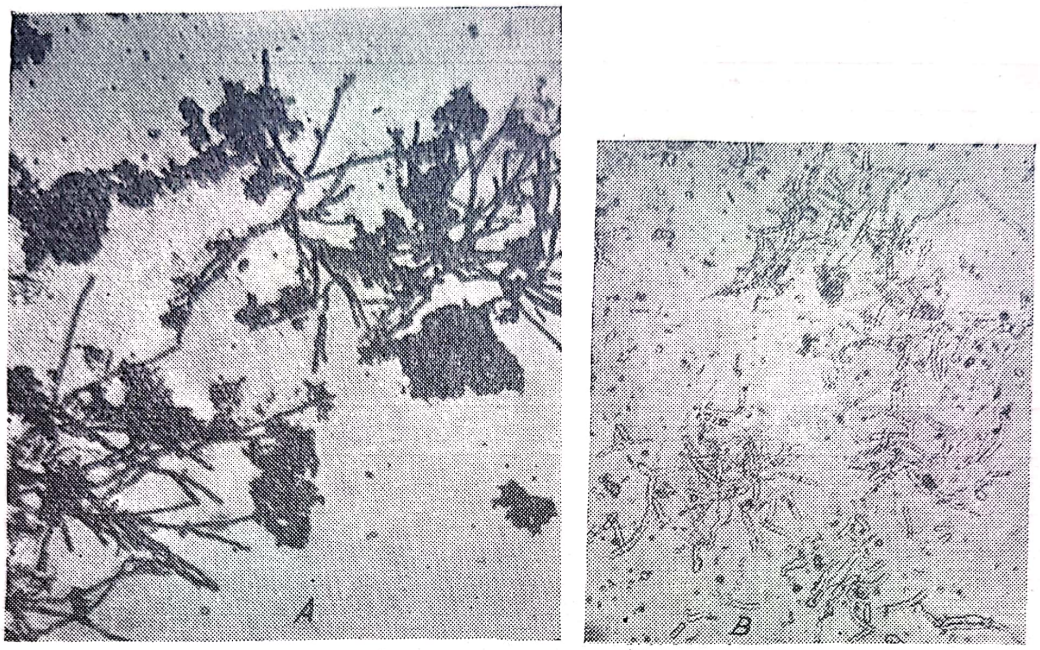


Fig. 454. *Penicillium chrysogenum.* Aspectul miceliului de maturaţie, cu elaborare masivă de antibiotic (*A*) şi în faza tardivă de creştere (*B*) caracterizată prin semne de îmbătrînire incipientă a culturii, corespunzînd perioadei în care producerea de antibiotic începe să scadă (după Rule).

gradului ei de aerare, şi un agent antispumant care combate formarea de spumă datorită agitării, aerării şi acţiunii agentului tensioactiv.

Microorganismul producător care este însămînţat masiv în mediu este reprezentat de o cultură selecţionată de *Penicillium chrysogenum*, înalt producătoare, selecţionată prin mutageneză. În mod obişnuit însă, aceste microorganisme produc în mediu sinteza a mai multor tipuri de penicilină care au acelaşi nucleu de bază — β-lactamthiazolidin, dar care diferă între ele după natura lanţului lateral legat de acest nucleu.

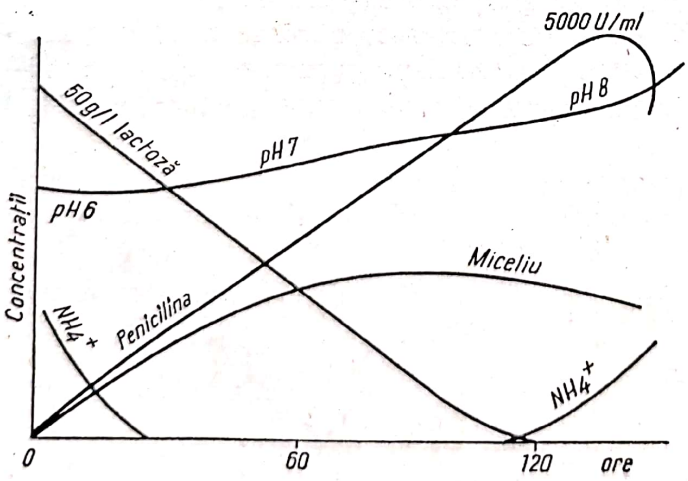


Fig. 455. Dinamica procesului de biosinteză a penicilinei şi modificările chimice şi biologice ale mediului de cultură.

Întrucît separarea acestor peniciline prin purificare este dificilă, se creează de obicei condiţii de mediu care să asigure formarea unui anumit tip de penicilină, inhibînd concomitent producerea celorlalte tipuri. Substanţele precursor adăugate în mediu în acest scop reprezintă porţiuni din molecula finală a antibioticului,

care sînt folosite preferenţial de microorganism pentru sinteză. În cazul penicilinei *G*, substanţa precursor este acidul fenilacetic sau unul din derivaţii săi (fenilacetatul de Na şi fenilacetamida), care este adăugat ca atare şi, în plus, obţinut şi din transformarea feniletilaminei din extractul de porumb în acid fenilacetic. Faza de „fermentaţie" durează circa 120 de ore la 25°C şi cuprinde trei etape succesive: *1) etapa iniţială de creştere a microorganismului*, cu producţie slabă de antibiotic; *2) etapa de maturaţie*, cu *elaborarea masivă de antibiotice; 3) etapa de declin* sau de *îmbătrînire*, în care producţia este nulă, şi în care survine chiar o degradare a antibioticului.

Dinamica procesului de biosinteză a antibioticului este urmărită prin controale periodice privind modificările biochimice (*p*H, concentraţia lactozei şi a NH_3), caracteristicile microbiologice (aspectul şi gradul de dezvoltare ale miceliului) şi activitatea antimicrobiană a mediului de cultură. Procesul este oprit în momentul în care lactoza din mediu este pe cale de dispariţie (întrucît miceliul lipsit de sursa de C este oprit în dezvoltare şi se lizează) şi în care în mediu apare NH_3 (deoarece penicilina este instabilă în mediu alcalin).

Extracţia antibioticului. Lichidul obţinut la sfîrşitul fazei biologice este vîscos, cu miros puternic şi conţine substanţe toxice, produşi piretogeni (care produc ridicări de temperatură dacă sînt inoculaţi la animale) şi numeroase impurităţi care depăşesc de sute de ori cantitatea de antibiotic. Extracţia antibioticului din mediu se face cu ajutorul solvenţilor organici (acetat de amil la *p*H 2,5) pentru penicilină, prin separare şi dizolvare în solvenţi în cazul antibioticelor insolubile (tetraciclina) sau cu ajutorul răşinilor schimbătoare de ioni pentru streptomicină, neomicină. Antibioticul astfel separat este supus unui proces de purificare, sterilizare, spălare, cristalizare şi uscare în vid. Dacă îndeplineşte condiţiile de utilizare pe baza controalelor finale chimice, microbiologice şi toxicologice (pentru absenţa de toxicitate şi de substanţe piretogene) el este standardizat — în general în raport cu o

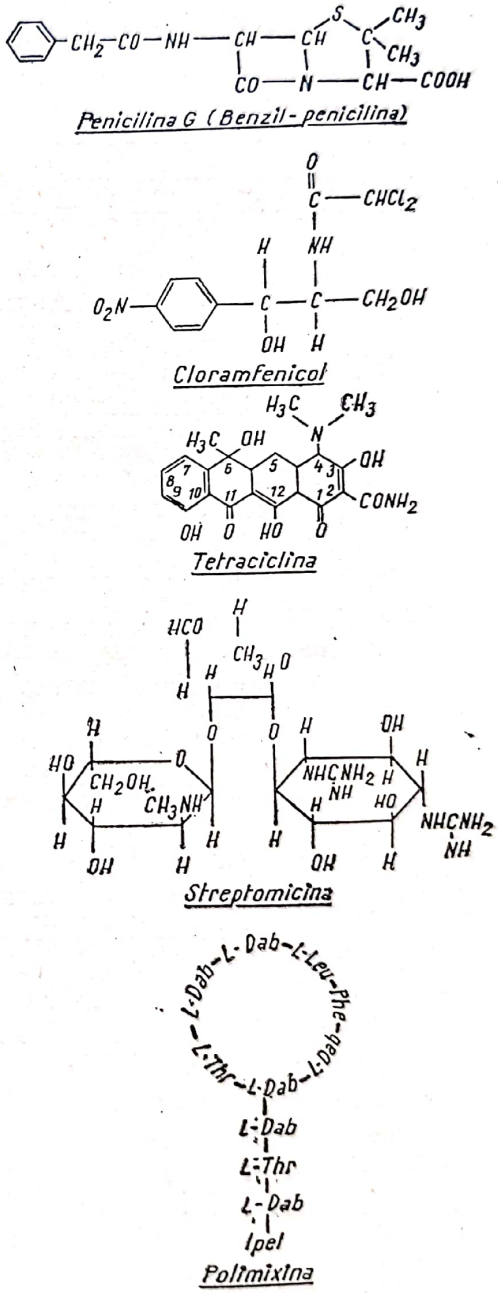


Fig. 456. Structura chimică a principalelor substanţe antibiotice.

unitate de activitate stabilită prin convenţie internaţională — şi trecut în faza ultimă de condiţionare (repartizare în fiole, flacoane etc.), sub formă de pulberi cristaline (prin sublimarea în vid a soluţiilor) sau incorporat în diferite substanţe.

Penicilina se prezintă ca o pulbere albă, microcristalină, hidrosolubilă şi netoxică pentru om, chiar în doze mult mai mari decît cele active faţă de microorganisme. Ea are un efect bacteriostatic şi bactericid asupra celulelor în faza de multiplicare activă, în special asupra cocilor Gram+ şi Gram— asupra unor bacili aerobi Gram+, aerobi şi anaerobi şi asupra spirochetelor. Ca activitate biologică, o unitate (U) corespunde la acea cantitate de penicilină care, adăugată la 50 ml de bulion, inhibă complet creşterea unei tulpini test, *S. aureus* Oxford. Pe baza unei convenţii internaţionale, această activitate este apreciată ca fiind corespunzătoare la 0,6 μ g benzil-penicilină sodică G cristalizată, pură (1 U.I.) — respectiv 1 mg substanţă pură=1 666 U.I.

a. Antibioticele semisintetice

Penicilinele naturale — obţinute prin „fermentaţie" biologică — diferă între ele prin natura catenei laterale legată de nucleul de bază reprezentat de acidul 6-amino-penicilanic. Natura acestui lanţ lateral este „dirijată" în raport cu natura precursorului, care este o substanţă chimică de sinteză adăugată în mediu şi încorporată de mucegai în molecula de penicilină. Chain a arătat că lanţul lateral al penicilinelor obişnuite poate fi separat de nucleu prin hidroliză, cu ajutorul unor enzime produse de bacterii sau actinomicete, obţinîndu-se cantităţi mari de nucleu în stare cristalină. Ulterior, grupul amino liber din nucleu poate fi acetilat cu o mare varietate de acizi, obţinîndu-se astfel un mare număr de peniciline noi, active asupra bacteriilor rezistente la penicilinele naturale.

b. Acţiunea antibioticelor asupra microorganismelor

Antibioticele pot exercita, spre exemplu, asupra bacteriilor, două efecte care reflectă de fapt gradul de intensitate a acţiunii antibiotice şi care pot fi apreciate adăugîndu-se cantităţi diferite de antibiotic în medii de cultură în care se însămînţează un acelaşi număr de germeni. Efectul *bacteriostatic* corespunde situaţiei în care numărul de bacterii prezente după 12 ore este inferior celui din mediile fără antibiotic, dar egal sau cu puţin superior aceluia al bacteriilor însămînţate iniţial. Acest efect este datorat unei încetiniri a ritmului de creştere a culturii, fără omorîrea celulelor bacteriene, exceptînd cazul unei acţiuni prelungite. Efectul *bactericid* corespunde unei distrugeri a germenilor inoculaţi şi se apreciază prin faptul că după 12 ore numărul bacteriilor viabile este inferior celui introdus prin însămînţare şi poate scădea pînă la sterilizarea mediului. În cazul unei concentraţii sub inhibitoare de antibiotice, creşterea bacteriilor evoluează normal, ca şi la martor, iar în cazul unora dintre antibiotice se poate observa chiar un fenomen de stimulare a creşterii (hormesis).

Acţiunea antibioticelor este *selectivă*. Spre deosebire de antiseptice şi dezinfectante, care îşi exercită efectul în mod egal asupra oricărei specii sau tulpini bacteriene, antibioticele au un spectru de activitate caracteristic. Datorită acestui fapt, un anumit antibiotic este foarte activ asupra unor grupe de bacterii, puţin activ asupra altora şi complet inactiv faţă de altele. Selectivitatea antibioticelor nu este numai calitativă, ci şi cantitativă: pentru inhibarea anumitor specii este necesară o cantitate de antibiotic mult mai mică decît pentru acelaşi efect exercitat asupra altor specii.

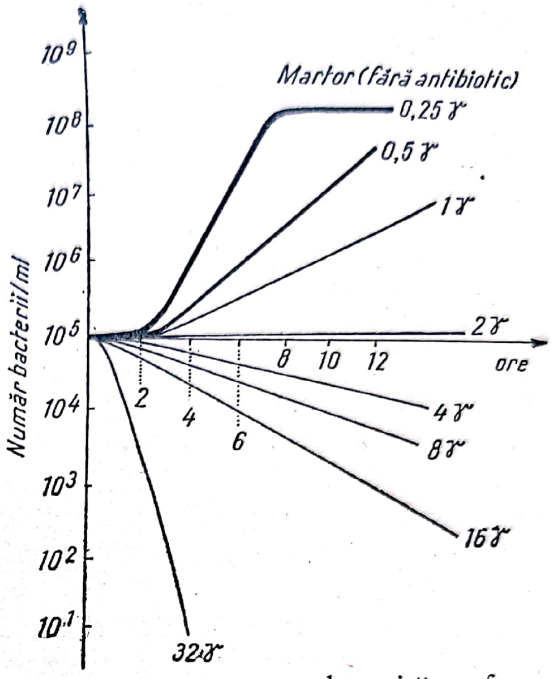


Fig. 457. Reprezentare schematică a efectului antibioticelor asupra bacteriilor. Concentraţiile mici sînt subinhibitoare şi permit o multiplicare similară aceleia din culturile fără antibiotic. Dozele mai mari (0,5—2 γ) sînt bacteriostatice: numărul celulelor este inferior aceluia din cultura martor de aceeaşi vîrstă, dar superior sau egal aceluia al celulelor însămînţate (10^5). Dozele mari (4—32 γ) au efect bactericid: ele diminuă numărul celulelor viabile pînă la sterilizare.

c. Mecanismul de acţiune al substanţelor antibiotice

O dată iniţiată interacţiunea sa cu o anumită zonă specifică de fixare de la suprafaţa celulei bacteriene sensibile, antibioticul amorsează un lanţ de reacţii succesive care duc final la inhibarea creşterii normale şi a diviziunii celulare şi, adesea, la moarte şi autoliză completă. După structura asupra căreia acţionează şi după mecanismul prin care se realizează efectul antimicrobian, antibioticele se împart în cîteva categorii:

1) *Antibioticele care împiedică sinteza peretelui celular*, ca, de exemplu, *penicilina*, acţionează prin inhibiţia specifică a sintezei unuia dintre constituienţii peretelui celular (cel mai adesea, probabil, a lizinei) sau prin interferenţă cu organizarea diferiţilor constituenţi parietali, într-un perete anatomic şi funcţional integru. Penicilina realizează acest efect fie blocînd transportul precursorilor peretelui celular prin membrana citoplasmatică, fie inhibînd activitatea enzimelor din această membrană care participă la sinteza peretelui celular. Deşi formarea de perete celular nou este oprită, bacteria creşte în dimensiuni, continuînd să sintetizeze proteine citoplasmatice. Lipsită de protecţia conferită de peretele celular rigid, celula bacteriană devine sensibilă la şocul osmotic, datorită căruia se lizează.

Acest mod de acţiune explică, în primul rînd, limitarea efectului antibiotic al penicilinei la celulele bacteriene în curs de creştere şi multiplicare (la care are loc o sinteză intensă de perete celular) şi în al doilea rînd, acţiunea sa

selectivă asupra bacteriilor, cu respectarea celulelor organismului animal care, fiind lipsite de perete rigid, nu au constituenţi parietali, a căror sinteză să fie suceptibilă de blocare prin penicilină.

2) *Antibioticele care afectează permeabilitatea membranei citoplasmatice,* ca, de exemplu, *polimixina, gramicidina, mistatina* determină o modificare fizico-chimică a membranei citoplasmice, care se traduce printr-o alterare a permeabilităţii ei, de felul aceleia produsă de detergenţii cationici. Această dezorganizare profundă a unei structuri celulare cu funcţii de importanţă vitală este urmată de moartea celulei.

3) *Antibioticele care inhibă sinteza proteinelor bacteriene,* cum sînt *cloramfenicolul, streptomicina, puromicina,* intervin în diferite etape ale desfăşurării acestui proces cu importanţă esenţială pentru celulă. Cloramfenicolul, spre exemplu, ar interfera cu fixarea de ARN pe ribozomi.

4) *Antibioticele care inhibă activitatea unui sistem enzimatic important pentru creşterea bacteriilor,* inhibă, spre exemplu, reacţiile de transfer de H ale metabolismului energetic (tetraciclinele) sau blochează primele etape ale ciclului lui Krebs şi diminuă respiraţia bacteriană (streptomicina).

5) *Antibioticele care blochează sinteza ADN* ca, de exemplu, *mitomicina* (substanţă antibacteriană şi antitumorală) blochează direct şi ireversibil sinteza ADN.

6) *Antibioticele care afectează transcrierea informaţiei genetice* ca, de exemplu, *actinomicinele,* inhibă sinteza de ARN_m, împiedicînd formarea de ARN complementar pe matriţa de ADN. Cum ARN_m bacterian are o viaţă scurtă şi se descompune rapid (în 2—3 minute), inhibarea sintezei lui duce rapid la oprirea sintezei proteinelor celulare.

Cunoaşterea mecanismului de acţiune al antibioticelor are o deosebită importanţă practică, deoarece asocierea lor adecvată poate să mărească efectul terapeutic (sinergism), în timp ce administrarea lor sub forma unor combinaţii întîmplătoare să aibă un efect negativ, cele două antibiotice putînd să se neutralizeze reciproc. Spre exemplu, în asociaţia penicilină-cloramfenicol, acesta

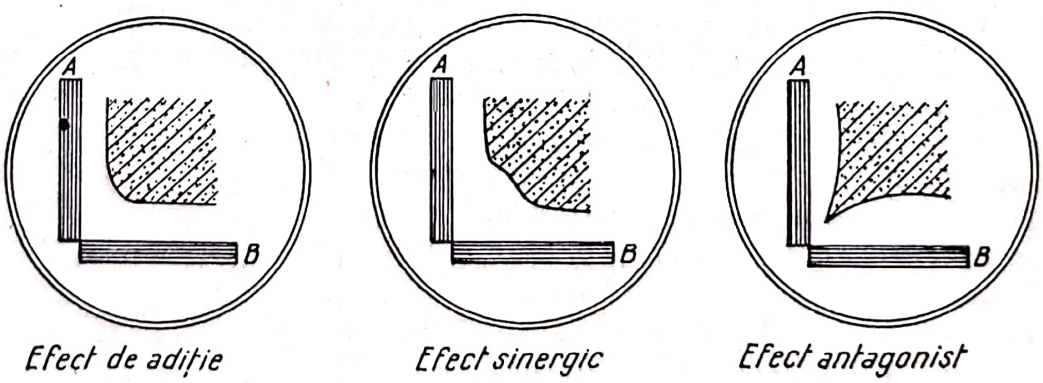


Fig. 458. Reprezentare schematică a acţiunii antimicrobiene a două antibiotice (*A* şi *B*) asociate: *efectul de adiţie simplă* echivalează aproximativ cu acela al unei doze duble din fiecare antibiotic separat; *efectul sinergic* este superior aceluia al adiţiei, iar cel *antagonist* se traduce prin neutralizarea reciprocă a activităţii celor două antibiotice.

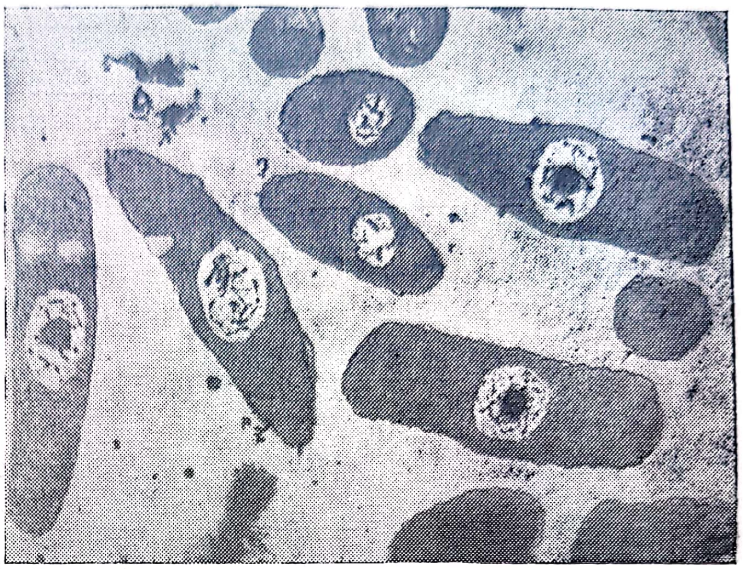


Fig. 459. Modificările materialului nuclear la *Escherichia coli* după tratare cu antibiotice (după Kellenberger).

din urmă se comportă ca un antagonist al penicilinei. Blocînd sinteza proteinelor citoplasmice, el el protejează celula faţă de liză prin şoc osmotic, consecutivă degradării peretelui celular indusă de penicilină.

Modificările celulelor bacteriene sub acţiunea antibioticelor sînt variabile şi interesează forma, dimensiunile, structura celulară şi caracterele de cultură. După intensitatea acestei acţiuni, Scanga recunoaşte alterări morfologice de trei grade: *1*) alterări uşoare, reversibile, cu îngroşarea corpului bacterian, care capătă un contur neregulat, însă cu păstrarea formei caracteristice şi a integrităţii celulare; 2) modificări mai accentuate, greu reversibile, cu îngroşarea şi alungirea celulei, cu clarificarea protoplasmei, însoţită de dezintegrarea ei mai mult sau mai puţin completă, dar cu păstrarea integrităţii peretelui celular; 3) alterări grave, ireversibile, cu citoliză pronunţată, distrugerea membranei citoplasmatice şi fragmentarea peretelui celular.

d. Rezistenţa la antibiotice

Rezistenţa naturală se referă la capacitatea normală a anumitor microorganisme de a nu fi niciodată influenţate de acţiunea unui anumit antibiotic. De exemplu, *Mycobacterium tuberculosis* — bacilul tuberculozei — este rezistent în mod natural la acţiunea penicilinei. Acest fenomen este întîlnit şi în condiţii naturale: unele dintre speciile de microorganisme expuse la acţiunea antibioticelor sînt inhibate şi oprite în dezvoltare, în timp ce altele cresc nestingherite în contact cu antagoniştii producători de antibiotice.

Nu se cunosc factorii determinanţi ai rezistenţei naturale, care ar fi legată de capacitatea de inactivare sau de distrugere a antibioticului. Se ştie numai că bacteriile rezistente la penicilină datoresc de obicei această însuşire proprietăţii lor de a elabora o enzimă inductibilă, penicilinaza, care inactivează antibioticul în mediu sau intracelular, desfăcînd inelul β-lactam şi transformîndu-l

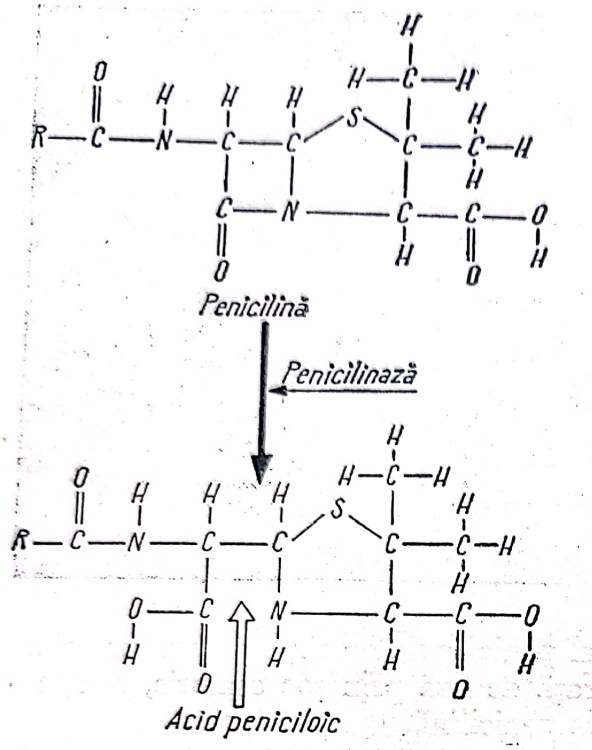


Fig. 460. Mecanismul inactivării penicilinei sub acţiunea penicilinazei: deschiderea ciclului caracteristic β-lactam şi formarea de acid peniciloic care nu este antibiotic.

în acid peniciloic, lipsit de activitate antibiotică.

Rezistenţa dobîndită la antibiotice, considerată în trecut ca fiind rezultatul unui fenomen de adaptare treptată începînd cu doze subinhibitoare de antibiotic, este atribuită în prezent la două cauze: *mutaţia* urmată de selecţie şi *infectarea cu un factor de rezistenţă* transmisibil.

Rezistenţa consecutivă unei mutaţii spontane apare, spre exemplu într-o populaţie de stafilococi sensibili la penicilină, cu o frecvenţă foarte mică, de ordinul a 1 bacterie rezistentă la 10^7—10^8 celule sensibile. În condiţii normale (în absenţa antibioticului) este probabil ca această mutaţie să nu ofere nici un avantaj pentru supravieţuire, deoarece mutantele se multiplică într-un ritm mai lent. În medii cu penicilină însă, antibioticul exercită un efect selectiv, în sensul că distruge bacteriile sensibile şi le lasă să se multiplice pe cele rezistente. Prin acest mecanism, repetat în prezenţa a diferite antibiotice, celulele bacteriene pot acumula succesiv caractere de rezistenţă faţă de un număr mare de antibiotice.

Rezistenţa infecţioasă la antibiotice este datorată prezenţei în celula bacteriană a factorului „R". Ea este caracterizată prin multiplicitatea ei, adică prin faptul că se instalează concomitent faţă de mai multe antibiotice, spre deosebire de rezistenţa dobîndită prin mutaţie, care survine ca o modificare a sensibilităţii celulei numai faţă de o anumită substanţă antibacteriană, faţă de două asemenea substanţe înrudite, sau chiar faţă de mai multe antibiotice, dar apărînd totdeauna *succesiv* pentru fiecare din ele.

Mecanismul rezistenţei dobîndite este complex şi neelucidat, exceptînd cazul rezistenţei la penicilină, care este explicată prin scindarea antibioticului sub acţiunea penicilinazei. S-a admis intervenţia a diferite mecanisme, ca: *1)* o modificare a metabolismului bacterian care să permită celulei să se dispenseze de metabolitul esenţial sau de reacţia blocată de antibiotic, realizîndu-şi biosintezele corespunzătoare pe o cale ocolită; *2)* sinteza compensatoare în cantităţi crescute a metabolitului expus la inactivare, în aşa fel încît el să rămînă totdeauna în exces, deci utilizabil pentru celulă, sau *3)* capacitatea bacteriei rezistente de a bloca şi inactiva antibioticul, sau chiar de a deveni dependentă de acesta.

c. Utilizările antibioticelor

1) *Utilizarea antibioticelor în terapeutică.* Proprietăţile antimicrobiene ale acestor substanţe şi-au găsit aplicarea majoră în terapia antiinfecţioasă. Pentru tratamentele aplicate la om şi animale, antibioticul este ales în funcţie de spectrul său de activitate teoretic valabil pentru agentul patogen respectiv şi, de preferinţă, după testarea calitativă şi chiar cantitativă a sensibilităţii acestuia, în cazurile în care agentul patogen a fost deja izolat din organismul bolnav [1].

Doza optimă pentru obţinerea efectului terapeutic este aleasă în funcţie de o serie de factori care ţin de particularităţile antibioticului (absorbţia, difuzibilitate în organism, eliminare) şi ale organismului (greutate corporală, forma clinică a bolii etc.). Tratamentul trebuie să fie început cît mai precoce, antibioticul fiind administrat sub formă de doze terapeutice repetate la intervale regulate şi se continuă pînă la consolidarea definitivă a vindecării.

2) *Utilizarea antibioticelor în patologia vegetală.* Combaterea bolilor plantelor cu ajutorul antibioticelor se poate face prin tratarea seminţelor înainte

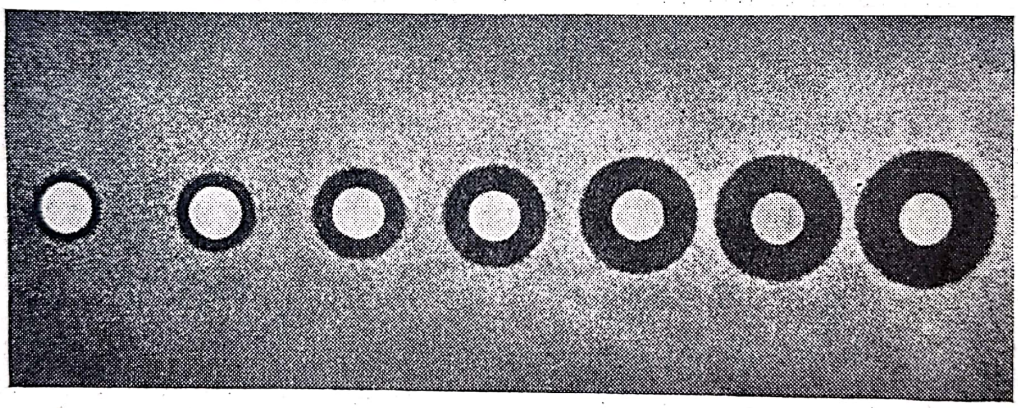


Fig. 461. Determinarea cantitativă a sensibilităţii la penicilină. Rondelele conţin cantităţi crescînde de antibiotic de la 10 u *(stînga)* la 10 000 u. Se observă diferenţe nete de mărime a suprafeţei în care creşterea culturii este inhibată în raport cu concentraţia antibioticului (după Stanier).

[1] Determinarea sensibilităţii la antibiotice se face în mod curent, aplicîndu-se pe suprafaţa unei plăci cu mediu de cultură, însămînţată cu tulpina microbiană de cercetat, rondele de hîrtie de filtru impregnate fiecare cu alt antibiotic. Substanţa antibiotică difuzează în agar de jur împrejurul locului unde au fost depuse rondelele, formînd o zonă de difuzie cu intensitate descrescîndă de la rondelă spre periferie, corespunzător unui gradient de concentraţie a antibioticului. În cazul în care bacteria este sensibilă la un antibiotic, în jurul rondelei respective se produce o zonă de inhibiţie a dezvoltării culturii. Inhibiţia creşterii bacteriene este maximă în imediata apropiere a rondelei şi are o întindere proporţională cu sensibilitatea germenului la antibiotic. În zonele în care antibioticul nu a difuzat, ca şi în cazul cînd bacteria este rezistentă, toată suprafaţa mediului din jurul rondelei este acoperită de un strat compact de cultură. Dozele slabe de antibiotic, incapabile să producă inhibiţia culturii, pot avea chiar un efect invers, stimulator, care se traduce prin apariţia la marginea ariei de inhibiţie a unei zone în care creşterea bacteriană este intensificată.

de însămînţare, prin pulverizarea părţilor aeriene bolnave ale plantelor sau prin introducerea antibioticului direct în sol. Ultima metodă are dezavantaje legate de fenomenele de adsorbţie, inactivare şi degradare sub acţiunea microflorei solului, care o fac neeficace şi neeconomică. Activitatea antimicrobiană este condiţionată de absorbţia antibioticului în plantă, care se poate face fie prin rădăcini, fie prin frunze (mai ales prin faţa lor inferioară) şi este mărită prin adăugarea a diferite substanţe care măresc permeabilitatea cuticulei. Antibioticele, care persistă în plante vreme îndelungată (zile, săptămîni, şi chiar ani), dispar mai întîi din frunze, apoi din tulpină şi în cele din urmă din rădăcină, în urma unor procese de degradare treptată. Antibioticele pot fi utilizate şi în scop profilactic, pentru a împiedica apariţia unor boli infecţioase sau pentru a mări rezistenţa plantelor la infecţii.

3) *Conservarea alimentelor cu antibiotice.* Recomandat în multe ţări, acest procedeu este limitat prin lege în altele datorită temerilor că alimentul astfel conservat ar putea să conţină germeni patogeni rezistenţi, care, pe această cale, ar putea fi răspîndiţi în populaţie, sau că urmele de antibiotic consumat ar putea produce la oameni reacţii de hipersensibilitate (alergie), care ar obliga la excluderea în viitor a contactului terapeutic cu antibioticul respectiv.

4) *Utilizarea antibioticelor în zootehnie.* Unele antibiotice ca aureomicina, teramicina şi mai puţin streptomicina şi penicilina au proprietatea de a stimula creşterea animalelor tinere (purcei, viţei şi păsări), determinînd un spor de greutate (10—30% faţă de animalele martor), asociat cu ameliorarea stării generale şi a rezistenţei la boli. Se folosesc în acest scop antibiotice native (masă miceliană sau lichid de cultură) sau antibiotice speciale nepurificate (furajere), asociate în cantităţi mici la hrana obişnuită (20 g antibiotic/tona de furaj). Mecanismul prin care se realizează această stimulare este complex şi implică, în primul rînd, acţiunea antibioticului asupra microflorei intestinale, cu limitarea dezvoltării unor microorganisme dăunătoare care produc mai ales infecţii subclinice cu influenţă nefavorabilă asupra creşterii. Se adaugă la aceasta efectul stimulator direct asupra organismului animal legat de intensificarea absorbţiei substanţelor nutritive în intestin şi utilizarea mai economică a proteinelor alimentare, ca şi de o ameliorare a metabolismului general. În sfîrşit, modificarea echilibrului microflorei intestinale favorizează dezvoltarea microorganismelor capabile să sintetizeze vitamine ca tiamina, riboflavina, acidul folic, acidul pantotenic, biotina, vitamina B_{12} şi vitamina K.

11. UTILIZAREA MICROORGANISMELOR ÎN SINTEZE CHIMICE

Cunoaşterea activităţilor metabolice ale microorganismelor a permis extinderea utilizării lor ca atare sau în asociere cu procedee de sinteză chimică pentru obţinerea unor substanţe de interes industrial.

În unele cazuri, un anumit produs metabolic al microorganismelor poate servi ca substrat în sinteza chimică pe cale industrială a unei substanţe, astfel încît rolul microorganismelor este acela de a realiza primele stadii ale sintezei.

În această categorie intră producerea de 2,3 butaniol (folosit la prepararea cauciucului sintetic), producerea de acid ustilagic sau aceea a acidului α-cetoglutaric (utilizat la prepararea acidului glutamic) etc.

Alteori, microorganismele sînt folosite pentru a efectua transformări specifice în cursul unei anumite sinteze, şi în special acele transformări care se obţin foarte greu sau în timp prea îndelungat dacă se utilizează tehnici uzuale de chimie. În acest caz, microorganismele acţionează ca adevăraţi reactivi vii.

În afară de aplicaţiile tehnologice vechi de sute de ani (topitul inului, zaharificarea cerealelor, depilarea blănurilor etc.), în care microorganismele sînt folosite de obicei pentru a produce modificări chimice prin degradarea anumitor substraturi, în ultimii ani microorganismele îşi găsesc curent întrebuinţări şi în realizarea unor transformări specifice necesare în procese de sinteză ca acelea implicate, de exemplu, în prepararea acidului ascorbic, a hormonilor steroizi etc.

Transformarea microbiană a steroizilor. Aplicarea ei la sinteza hormonilor steroizi. După descoperirea utilităţii cortizonului în terapeutică s-au făcut numeroase încercări de a-l obţine în cantităţi mari. Extragerea hormonilor corticosteroizi din glandele suprarenale este foarte costisitoare din cauza dificultăţilor de procurare a acestora şi a randamentului mic al extracţiei. Obţinerea acestor hormoni pe cale de sinteză chimică este de asemenea dificilă şi costisitoare. Sinteza cortizonului din acid dezoxicolic necesită 36 de procese sau etape tehnologice, randamentul este foarte mic (1—2‰), iar materia primă (bila) se găseşte greu în cantităţi atît de mari. Principalul obstacol de ordin tehnic îl constituie introducerea unui atom de oxigen în poziţia C_{11} a unui nucleu steroidic natural, etapă fundamentală în transformarea chimică a steroizilor în cortizon, deoarece de prezenţa atomului de oxigen în această poziţie este legat efectul antiinflamator al hormonilor corticosteroizi. Problema a fost în mare măsură rezolvată cînd Petersen şi Murray (1952) au demonstrat posibilitatea de a se realiza această oxidare cu ajutorul mucegaiului *Rhizopus arrhizus*.

Substratul acţiunii microbiene este nucleul steroidic al progesteronului (la poziţia 11α), substanţă mult mai apropiată ca structură chimică de cortizon decît acidul dezoxicolic şi care, la rîndul său, este obţinut din steroizi vegetali [1]

Randamentul este de 90%, iar produsul final este obţinut după încă 11 trepte chimice (în loc de 36 cîte erau necesare iniţial).

Prin urmare, principiul de bază al acestor procese este acela de a se folosi activitatea microbiană pentru a transforma o serie de steroizi de bază, găsiţi în cantitate mare în natură. Pornind de la produşii intermediari-cheie astfel rezultaţi, se poate ajunge pe o cale de sinteză mult simplificată, la obţinerea unui număr mare de steroizi noi, analogi chimic dar cu activităţi hormonale şi biologice mai mari sau diferite. În ultimii ani au fost descoperite microorganisme capabile să facă hidroxilări, hidrogenări şi dehidrogenări în diferite

[1] Steroizii vegetali sau sapogeninele se găsesc, sub formă de glicozide denumite *saponine*, în cantităţi mari şi uşor de obţinut într-o serie de plante ca *Agave*, *Dioscorea*, *Lilium*, *Yucca* etc.

Scanned with OKEN Scanner

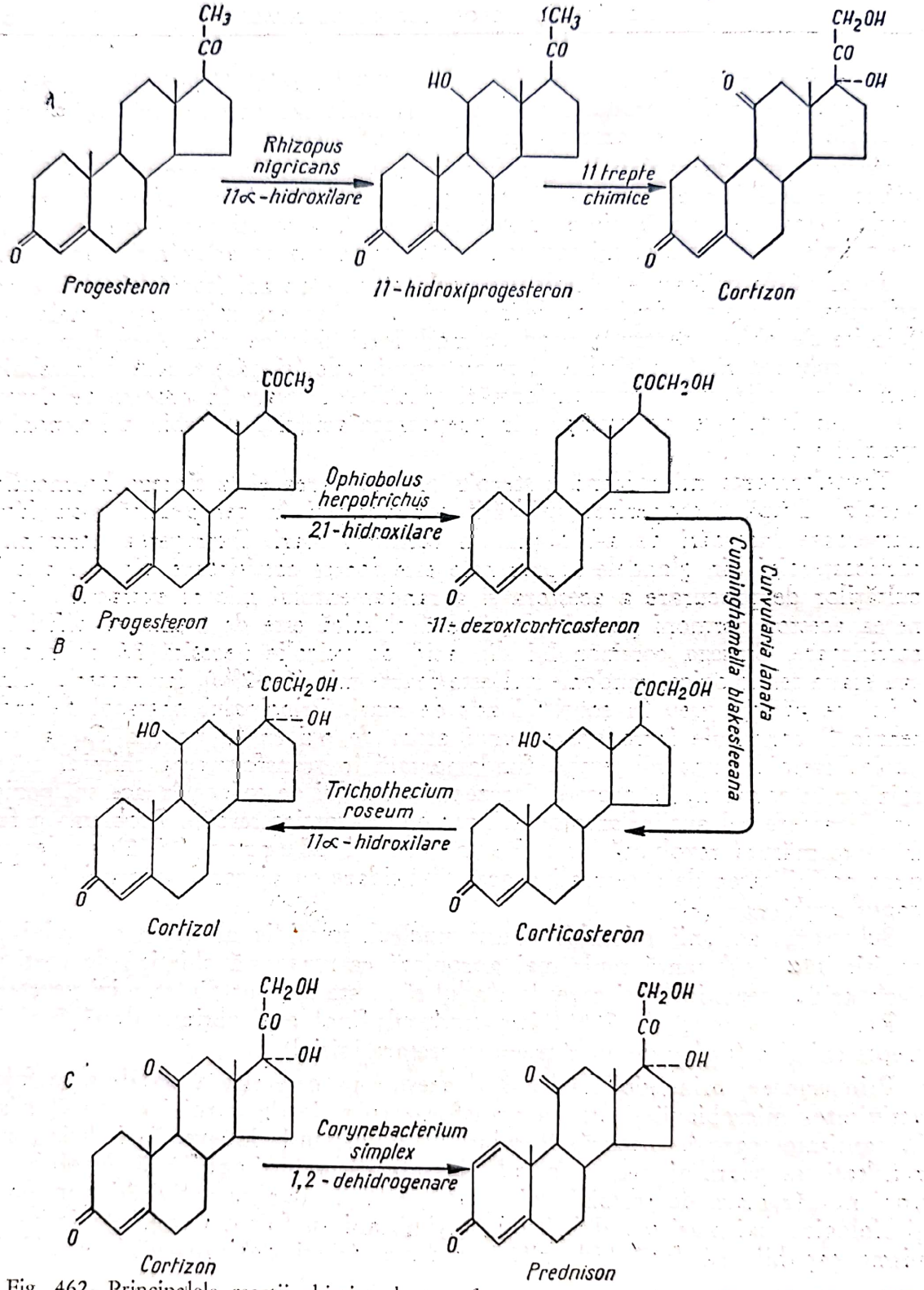


Fig. 462. Principalele reacţii chimice de transformare a steroizilor şi microorganismele care le produc:

A — transformarea progesteronului în cortizon; *B* — transformarea progesteronului în corticosteron şi cortizon; *C* — transformarea cortizonului în prednison (prednisolon).

poziţii specifice ale inelului steroidic, ceea ce a permis reducerea importantă (la numai 4 trepte) a proceselor efectuate pe cale chimică.

Transformările steroizilor se fac în tancuri de mare capacitate pentru culturi în profunzime, cu aerare şi agitare continuă. Din punct de vedere chimic şi biologic procesul este fundamental diferit de acela de obţinere a antibioticelor, a vitaminelor etc., produşi sintetizaţi de microorganisme pornind de la compuşii din mediu care servesc în acelaşi timp ca substrat pentru creşterea şi multiplicarea celulelor. Dimpotrivă, substanţele steroidice sînt adăugate abia spre sfîrşitul fazei de creştere şi suferă numai cîteva modificări chimice, mici dar foarte importante, fiind determinante pentru particularităţile farmacologice ale substanţelor astfel obţinute. Cînd transformarea substratului steroidic este completă, cultura este îndepărtată, iar filtratul este tratat cu un solvent al steroizilor cum sînt cloroformul sau tricloretilena, separîndu-se pînă la 95% din produsul transformat. De astă dată microorganismele se comportă ca reactivi *sui-generis*, cu acţiune specifică şi care realizează uşor, cu randament mare, un proces mult mai greu de realizat pe cale de sinteză chimică.

12. PRODUCEREA DE ALCALOIZI DERIVAŢI AI ACIDULUI LISERGIC

Majoritatea alcaloizilor se obţin prin izolare din plantele superioare. Dintre alcaloizii produşi de plantele inferioare, mult utilizaţi în terapeutică sînt ergotina şi substanţele înrudite, derivate ale acidului lisergic, care sînt preparate în mod obişnuit din corpii în formă de pinten („cornul secarei"), găsiţi în spicul plantelor de secară, grîu, ovăz ş. a., parazitate de ciuperca *Claviceps purpurea*. În aceste formaţiuni, parazitul se găseşte în stadiul de *scleroţi* care reprezintă o formă de repaus, mai rezistentă la condiţii nefavorabile de mediu în raport cu forma vegetativă hifală, şi care practic ia locul seminţelor distruse. Oamenii sau animalele care consumă secară infectată cu *Claviceps purpurea* prezintă semne toxice grave datorită acţiunii alcaloizilor conţinuţi în scleroţi. Unul dintre aceşti alcaloizi, *ergometrina*, este folosit pentru proprietăţile sale de a produce contracţia muşchilor netezi, în special uterini (putere ocitocică), ceea ce grăbeşte naşterea şi opreşte hemoragiile uterine. Un altul, *ergotamina* atenuează migrena. În general, aceşti alcaloizi blochează direct şi relativ rapid sistemul nervos simpatic. În industria farmaceutică ei sînt folosiţi ca material de plecare pentru sinteza unor derivaţi cu eficienţă terapeutică mare şi cu modificări importante ale spectrului fundamental de activitate.

Pînă în ultimii ani, ergotina se prepara prin extracţie din cornul secarei (scleroţiul de *Claviceps purpurea*), obţinut prin infectarea artificială a plantelor de secară. Metoda are inconveniente majore, deoarece infecţia este condiţionată de factori climatici (temperatură şi umiditate), durează o perioadă de vegetaţie şi implică răspîndirea intenţionată în natură a unui agent patogen. De aceea, în prezent ea este pe cale de a fi complet abandonată, ca

urmare a obţinerii unor tulpini de *Claviceps* capabile ca, în culturi pure, să sintetizeze şi să acumuleze cantităţi foarte mari de alcaloid.

Astfel, Abe a obţinut rezultate bune cultivînd parazitul pe medii relativ simple (manitol, glucoză, succinat de NH_4, KH_2PO_4 etc.). Recent (1960), Chain a izolat de la o graminee spontană, *Paspalum distichum*, o tulpină de *Claviceps paspali*, care pe medii artificiale produce abundent structuri similare scleroţilor, determinînd acumularea în profunzime a 2—5 mg/ml alcaloizi, în special α-hidroxietilamida acidului lisergic. Acest alcaloid poate fi apoi transformat în amida acidului lisergic — nucleul alcaloizilor din cornul secarei — de la care se obţin mai mulţi derivaţi cu acţiune farmacologică diferită. Situaţia este similară aceleia a penicilinelor semisintetice: nucleul este produs pe calea activităţii microbiene, iar catena laterală este sintetizată şi introdusă în nucleu prin metode chimice (Chain).

13. UTILIZAREA PREPARATELOR ENZIMATICE MICROBIENE ÎN INDUSTRIE

Reacţiile chimice catalizate de enzime sînt cunoscute, prin efectele lor, încă din antichitate, utilizarea lor empirică precedînd cu sute şi chiar mii de ani izolarea, identificarea, descifrarea şi elucidarea funcţiei enzimelor, ca şi cunoaşterea microorganismelor care le elaborează. Fermentaţia alcoolică a mustului de strugure şi a altor sucuri de fructe, oţetirea vinului, acrirea laptelui, topitul plantelor textile sînt exemple de folosire empirică, de vreme foarte îndelungată, a unor reacţii enzimatice.

Natura enzimatică a proceselor fermentative a fost pusă în evidenţă de Buchner (1897), care a constatat că după mojararea cu nisip de cuarţ a celulelor de drojdie, principiul activ al fermentaţiei alcoolice, capabil să fermenteze zahărul la alcool şi CO_2, trece în extractul acelular obţinut prin separare. Acest principiu activ este reprezentat de sistemul enzimatic pe care Buchner l-a denumit *zimaza*.

Posibilitatea folosirii microorganismelor ca sursă de enzime a fost demonstrată de Takamine (1914) care, la producerea spirtului, a înlocuit malţul cu enzime amilolitice, produse de mucegaiuri.

Utilizarea microorganismelor ca sursă de enzime are o serie de avantaje în raport cu extracţia acestor substanţe din ţesuturi vegetale sau animale: *1*) microorganismele pot fi obţinute cu uşurinţă în cantităţi mari datorită unui potenţial de multiplicare neobişnuit de mare; *2*) numărul enzimelor care pot fi izolate de la microorganisme este mult superior aceluia al enzimelor, avînd ca sursă organismele superioare, datorită bogăţiei echipamentului enzimatic microbian, capacităţii microorganismelor de a forma enzime induse, precum şi posibilităţii de a se regla producerea de enzime prin modificarea condiţiilor de cultură şi de a se obţine relativ uşor mutanţi cu productivitate ridicată; *3*) mediile de cultură folosite în practică sînt de cele mai multe ori foarte ieftine şi disponibile în cantităţi mari, deoarece ele constau fie din deşeuri care astfel sînt recuperate, fie din subproduse ale industriei alimentare (tărîţe

de grîu, extract de porumb etc.). În plus, acest tip de producție nu necesită instalații costisitoare, nici cîmp de cultură și poate fi realizat permanent, fără fluctuațiile inerente producerii de enzime din organe de animale sau țesuturi vegetale.

Preparatele enzimatice au numeroase aplicații în industrie datorită unor însemnate avantaje față de reactivii chimici sau față de acțiunea directă a microorganismelor. Astfel, ele au o acțiune specifică, lucrează de obicei cu viteză mare în condiții moderate de temperatură, presiune și *p*H, sînt active în concentrații mici, sînt netoxice (caracteristică importantă pentru industria alimentară), pot fi inactivate în condiții „blînde" după ce și-au îndeplinit acțiunea, activitatea lor poate fi mai bine standardizată și sînt mai ușor de manipulat și conservat.

Unele enzime sînt *extracelulare* și ca atare se găsesc libere în mediul de cultură, putînd fi obținute prin simpla centrifugare sau filtrare a acestuia. Altele, enzimele *intracelulare*, pot fi separate numai după ruperea membranelor celulare și dezintegrarea microorganismelor prin procedee ca: măcinare sau agitare cu abrazivi fini, congelări și decongelări repetate, variații bruște de presiune-descompresiune, expunere la vibrații ultrasonice sau autoliză (degradare celulară necontrolată, sub acțiunea enzimelor proprii).

După extracție, preparatele enzimatice pot fi folosite ca atare, în stare brută, sau după o prealabilă purificare (clarificare, concentrare, precipitări repetate, cristalizare). În acest din urmă caz devine posibilă *standardizarea* preparatului enzimatic în raport cu activitatea lui asupra unei anumite cantități de substrat, care este utilizat în condiții riguros controlate.

Microorganismele producătoare sînt alese în așa fel încît să se asigure o producție de enzime nu numai ridicată, ci și constantă, în sensul unui randament lipsit de fluctuații și al unei stabilități perfecte a produsului, care nu trebuie să fie degradat sau asociat cu produși dăunători ori toxici ai metabolismului microbian.

a. Preparatele enzimatice polizaharidolitice

Preparatele enzimatice de origine microbiană, capabile să acționeze asupra polizaharidelor sînt cele mai mult folosite, conținînd primele enzime cunoscute.

1) *Preparatele amilolitice.* Amidonul, principalul glucid de rezervă din țesuturile vegetale, constă dintr-un amestec de două polizaharide: amilaza (un polimer liniar de 1 : 4 α-glucoză) și amilopectina (polimer ramificat de 1 : 4 α-glucoză). Degradarea lui hidrolitică este realizată de obicei de un amestec de patru enzime: α-amilaza, β-amilaza, dextrinaza și glucoamilaza (amiloglucozidaza, care este o maltază).

Aceste enzime pot fi produse de bacterii (*B. subtilis, B. diastaticus, B. stearothermophilus, B. mesentericus, B. polymyxa* etc.) și de mucegaiuri ca *Aspergillus oryzae, A. niger.* Ele sînt utilizate în industria spirtului pentru zaharificarea plămezii de cereale înaintea fermentației, în panificație pentru îmbunătățirea făinurilor cu o slabă activitate α-amilazică (pentru a mări eliberarea

Fig. 463. *Aspergillus* sp. Hifă fertilă purtînd conidii (microscopie în contrast de fază) (după Fiala).

de maltoză în timpul plămădirii şi pregătirii aluatului), în industriile sucurilor de fructe şi berii, pentru îndepărtarea amidonului şi clarificarea lichidului, în industria textilă pentru îndepărtarea dextrinei (depusă pe firele de bumbac în vederea protejării lor de roaderea prin frecare în timpul ţesutului).

2) *Preparatele pectinolitice* (*pectinazele*), produse de bacterii, sînt utilizate pentru topitul biologic al plantelor textile, iar cele elaborate de mucegaiuri (*Aspergillus niger*) în industria sucurilor de fructe şi în vinificaţie, pentru degradarea pectinelor lor.

3) *Invertaza*, denumită şi *zaharaza* sau *sucraza*, enzimă produsă în special de levuri, catalizează hidroliza sau inversiunea zaharozei la un amestec de glucoză şi fructoză. Procesul este deosebit de important deoarece zahărul invertit (amestecul de glucoză şi fructoză) este mai solubil decît dizaharidul şi, ca urmare, concentraţia în zahăr a unui produs poate fi mărită fără să se producă fenomenul nedorit de cristalizare. În plus, amestecul celor două monozaharide este mai higroscopic şi astfel produsul îşi menţine umiditatea. Invertaza este folosită la fabricarea bomboanelor.

b. Preparatele enzimatice proteolitice

Proteazele pot fi obţinute din culturi de bacterii (*B. subtilis*, *Clostridium welchii*) sau de fungi ca *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Penicillium* sp. Ele se folosesc în industria alimentară (în panificaţie, la limpezirea berii pentru conservare, la stabilizarea laptelui concentrat etc.), în industria mătăsii, pentru îndepărtarea gelatinei sau cazeinei folosită ca material de protecţie a fibrelor faţă de roaderea prin ţesut, în industria cauciucului natural etc.

Proteazele microbiene sînt utilizate şi în procesul de „sămăluire" a pieilor, unde înlocuiesc excretele de păsări şi cîine, pentru a asigura îndepărtarea materialului necolagen şi înmuierea pielii. De asemenea, activitatea gelatinazică a culturilor de *A. oryzae* este folosită pentru recuperarea lînii de pe pieile de oaie de calitate inferioară.

În afara întrebuinţării lor în diferite procese tehnologice, enzimele microbiene îşi găsesc aplicaţii şi în domeniul ameliorării nutriţiei animalelor şi

omului. Astfel aceste enzime sînt adăugate cu bune rezultate la hrana animalelor, pentru accelerarea digestiei şi intensificarea asimilării, iar ca preparate polienzimatice (amilază, protează, celulară, fosfatază etc.), sînt administrate la om, pentru a compensa insuficienţa sucurilor digestive şi pentru a combate tulburările intestinale.

c. Penicilinaza

Această enzimă, care catalizează hidroliza legăturii peptidice din inelul β-lactam al moleculei de penicilină, este produsă, ca enzimă indusă, de numeroase bacterii, în special de *B. subtilis, B. anthracis, B. cereus, Staphylococcus aureus* etc. şi de actinomicete ca *Actinomyces candidus.* Ea este utilizată în industria produselor lactate, pentru a elimina acţiunea inhibitoare a laptelui asupra microorganismelor utile, în cazurile în care laptele supus fermentaţiei provine de la animale care au primit antibiotic. Penicilinaza mai este întrebuinţată în laboratoarele de microbiologie pentru a favoriza izolarea bacteriilor din produsele patologice recoltate de la bolnavi trataţi cu penicilină, precum şi în fabricile de penicilină pentru titrarea antibioticului.

d. Drojdia comprimată

Drojdia de brutărie, utilizată în panificaţie, numită impropriu „drojdie de bere", este obţinută pe cale industrială prin multiplicarea masivă a unor tulpini selecţionate de *S. cerevisiae,* avînd următoarele calităţi principale: *a*) putere mare de fermentaţie rezultînd din aptitudinea lor de a produce activ complexul enzimatic al zimazei; *b*) capacitatea de a suporta cantităţi mari din produsele normale ale fermentaţiei (alcool etilic şi CO_2); *c*) putere mare de multiplicare şi *d*) rezistenţă la conservare. Procesul de producţie care urmăreşte obţinerea unei cantităţi cît mai mari de celule este strict aerob (spre deosebire de fermentaţie, care este anaerobă), iar mediul de cultură uzual este *melasa,* lichid bogat în zahăr, vîscos, produs rezidual al fabricilor de zahăr din sfeclă. După înmulţire, celulele sînt separate prin centrifugare, iar masa celulară astfel obţinută este comprimată sub formă de cuburi (conţinînd 2×10^{10} celule/g), cu consistenţă densă, nelipicioasă, de culoare cenuşie-gălbuie, cu gust şi miros caracteristice.

14. UTILIZAREA MICROORGANISMELOR CA SURSĂ DE PRODUSE ALIMENTARE

Problema folosirii celulelor microbiene în alimentaţie, pusă pentru prima dată acum 50 de ani, este încă actuală, datorită mai multor factori între care sînt amintiţi: *1*) o mare parte din populaţia globului este subalimentată, iar aproximativ 2/3 din omenire suferă din cauza unei hrane deficitare cantitativ şi calitativ sub raportul proteinelor; 2) datorită multiplicării lor rapide, mi-

croorganismele pot fi obţinute în cantităţi mari într-un timp foarte scurt, mai ales cînd sînt cultivate prin tehnica actuală a *culturilor în profunzime* [1]; *3*) celula microbiană are un conţinut bogat în substanţe cu valoare nutritivă ridicată (aminoacizi, vitamine etc.); *4*) cultivarea microrganismelor se poate face pe medii simple, ceea ce permite valorificarea unor deşeuri cu potenţial economic scăzut.

Teoretic, obţinerea unor produse alimentare pornind de la microorganismele autotrofe, şi în special de la cele capabile de fotosinteză, este cea mai avantajoasă, deoarece aceste organisme au nevoie pentru creştere, numai de CO_2 atmosferic. Datele actuale privesc însă o gamă mult mai largă de microorganisme, inclusiv heterotrofe de diferite tipuri.

Algele (din genul *Chlorella*), cultivate în condiţii normale de mediu, folosesc energia luminoasă mult mai eficient decît cele mai multe culturi de cîmp. Iluminate zilnic timp de 8 ore şi apoi ţinute la întuneric 16 ore, ele dau producţii tot aşa de bune ca şi culturile iluminate continuu, deoarece celulele nu încetează să se multiplice exponenţial în timpul orelor de întuneric. Randamentul este mare: circa 15—30 tone de substanţă celulară uscată ha/an, aproximativ 50% proteină bogată în vitamine (în special β-caroten sau provitamina A), clorofilă şi xantofilă. În condiţiile lipsei de N, concentraţia în lipide creşte la 80—85% (faţă de valoarea normală de 20—25%). Specia cea mai utilă este *Chlorel la vulgaris* var. *viridis*. Dezavantajele metodei sînt legate de frecvenţa ridicată a infecţiilor bacteriene şi de suprafaţa mare pe care o ocupă instalaţiile necesare producţiei.

Levurile de tip *Candida (Torula) utilis* şi *S. cerevisiae* de fermentaţie superioară sînt microorganismele heterotrofe cel mai mult folosite ca sursă de proteină în hrana animalelor. Ele au o mare valoare biologică, datorită compoziţiei proteinei lor care include practic toţi aminoacizii esenţiali.

Levurile conţin uzual 14,4% lipide, însă în celulele speciei *Rhodotorula gracilis* dezvoltate în culturi submerse aerate şi cu deficit de N asimilabil, concentraţia lipidelor ajunge pînă la 64%. Levurile conţin de asemenea cantităţi însemnate de vitamină B_1 şi B_2.

Bacteriile au un conţinut ridicat în N (11,1% în medie) în raport cu levurile (8,2%) şi cu mucegaiurile (5,7%). Ele cresc pe medii simple şi constituie un supliment proteic bun pentru hrana animalelor deoarece conţin toţi aminoacizii esenţiali. Conţinutul mediu în proteine al celulelor bacteriene este cuprins între 63% (*B. subtilis*) şi 87% (*Lactobacillus fermentans*).

Producerea de proteine cu ajutorul microorganismelor care utilizează petrolul. Faptul că unele microorganisme pot folosi hidrocarburile ca unică sursă de C şi energie este cunoscut de aproximativ 50 de ani. Numai în ultimii

[1] Se apreciază (Thaysen, 1957) că un animal (un bovin) de circa 500 kg poate sintetiza în 24 de ore 0,500 kg proteină, iar 500 kg de plante soia sau mazăre dau în 24 de ore circa 36 kg de proteină. În condiţii ideale, 500 kg de levură produc în 24 de ore peste 50 t de proteină.

ani s-a propus însă ca celulele microbiene astfel obţinute să fie folosite ca hrană sau supliment de hrană pentru om şi animale, datorită bogăţiei lor în aminoacizi esenţiali şi în vitamine hidrosolubile. Experienţele efectuate la rafinăria Lavéra din Franţa (A. Champagnat) au arătat că în cursul dezvoltării lor bacteriile produc o deparafinare foarte avansată a fracţiunilor petroliere din mediu, iar hidrocarburile parafinice astfel rezultate şi care servesc ca substrat creşterii microbiene se transformă în concentrate de proteine şi vitamine (B_1, B_2, B_6, B_{12}, PP, acid pantotenic). Aceste concentrate, reprezentînd aproximativ 92,97% substanţă uscată, conţin 43,6% proteine, 18,5% lipide, 21,9% glucide, 4,43% substanţe minerale, vitamine etc. Compoziţia în aminoacizi a proteinei astfel obţinută este foarte asemănătoare aceleia a proteinelor animale.

Randamentul producţiei de concentrate proteice este foarte mare: dintr-o tonă de parafine normale se poate obţine aproximativ o tonă de concentrate proteine-vitamine. Întrucît sub acţiunea acestor microorganisme fracţiunile de petrol din mediu sînt profund deparafinate, se obţine implicit şi rafinarea petrolului. În timp ce deparafinarea prin metode clasice este costisitoare, iar parafinele obţinute rămîn fără întrebuinţare, prin deparafinare microbiană se valorifică parafinele din păcură, din motorinele grele şi din petrolul lampant, producînd în loc de parafine inutile concentrate de proteină-vitamină. Randamentul deparafinării biologice este foarte ridicat: din 10 tone de motorină parafinoasă rezultă 9 tone de motorină deparafinată şi o tonă de concentrate cu 10% conţinut proteic.

Materia primă cea mai potrivită pentru cultura industrială a acestor microorganisme sînt fracţiunile care distilă între 140—400°C, adică cele în care se găsesc petrol lampant şi motorină, amestecate în proporţie de 10% cu hidrocarburi parafinice normale integral metabolizate pe cale microbiană. În ceea ce priveşte microorganismele active, în timp ce unii cercetători consideră levurile din genul *Candida* ca fiind foarte avantajoase, autorii americani (M. J. Johnson) le acordă o importanţă limitată, datorită capacităţii lor de a ataca numai hidrocarburile din categoria alcanilor normali. După aceşti autori, bacteriile din genul *Mycobacterium* şi *Pseudomonas* ca şi actinomicetele din genul *Nocardia* au avantajul de a fi mai eficiente, degradînd o serie largă de alcani normali, ramificaţi şi ciclici ca şi foarte multe hidrocarburi aromatice.

Produsul finit, concentratul de proteine şi vitamine, se prezintă fie ca o făină de culoare bej deschis, utilizabilă ca atare sub formă de adaos la hrana animalelor, fie ca un *autolizat* în mediu apos, complet netoxic, fiind lipsit chiar de urme de hidrocarburi. Hrana de origine microbiană, indiferent de substratul folosit pentru multiplicarea microorganismelor, conţine cantităţi importante de aminoacizi, proteine şi lipide. Problema majoră nu este însă valoarea ei alimentară, ci acceptarea ei, care la animale ţine în special de aromă, iar la om de culoarea, textura şi mirosul produsului, dar mai ales de rezistenţa obişnuită a omului de a consuma un aliment atît de particular. În ţara noastră, această problemă se pune în prezent pe scară industrială numai pentru drojdiile furajere, utilizate ca supliment în hrana păsărilor şi a porcinelor. În acest caz, producţia de drojdii valorifică rumeguşurile şi leşiile

bisulfitice, reziduurile industriei hîrtiei (fabrica de la Zărnești), furnizînd un produs care conține în medie 50% proteină, 25—35% glucide, 2—3% lipide, 6—8% substanțe minerale etc.).

15. BAZELE MICROBIOLOGICE ALE CONSERVĂRII PRODUSELOR ALIMENTARE

Marea majoritate a produselor alimentare sînt bogate în substanțe organice și ca atare pot servi drept adevărate medii de cultură pentru foarte multe microorganisme. În afară de pagubele pe care le produce prin alterarea acestor produse, dezvoltarea microorganismelor poate provoca și intoxicații grave, în cazul în care determină acumularea de toxine microbiene în alimente nemodificate.

Metodele de conservare a alimentelor se bazează, în general, pe principiul de a crea, după caz, condiții în care microorganismele din alimente să fie distruse sau cel puțin în care multiplicarea lor să fie complet împiedicată.

Aceste metode pot fi clasificate, în funcție de mecanismul lor de acțiune, după cum urmează:

1) *Metodele de conservare bazate pe principiul biozei* se aplică fructelor și legumelor, care fiind părți vii ale unor plante, sînt capabile de respirație, deshidratare și coacere chiar după recoltare. Conservarea acestor alimente se face prin păstrare la 4—5°C în încăperi ventilate și se bazează pe principiul reducerii vitezei de desfășurare a proceselor biochimice la un nivel la care diminuează în mod corespunzător și viteza de multiplicare a microorganismelor.

2) *Metodele de conservare bazate pe principiul anabiozei* creează, prin păstrarea produselor alimentare la temperaturi scăzute, condițiile necesare pentru a împiedica activitatea biochimică și multiplicarea microflorei lor.

Aceste metode folosesc fie *refrigerarea* între 0° și 4°C pentru conservările de scurtă durată, fie congelarea la temperaturi cuprinse între —10 și —18°C (sub punctul de înghețare a sucului celular) pentru conservările mai îndelungate.

Prin acest tratament, activitatea microorganismelor încetează, ca rezultat al expunerii lor la temperaturi scăzute, incompatibile cu continuarea proceselor fiziologice, și ca urmare a deshidratării puternice a mediului reprezentat de produsele conservate, datorită formării cristalelor de gheață. Congelarea are dezavantajul că produce modificări fizico-chimice importante ale alimentelor, în urma cărora, la dezghețare, acestea pierd, prin topirea cristalelor de gheață, o cantitate mare de suc celular bogat în substanțe nutritive. Acest suc celular reprezintă un mediu nutritiv favorabil pentru microorganismele menținute pînă atunci în anabioză, care încep să se dezvolte rapid, alterînd produsul alimentar într-un timp foarte scurt. De aseea, dezghețarea produselor congelate trebuie făcută numai imediat înaintea folosirii lor.

Alimentele conservate prin frig pot fi totuși alterate prin acțiunea microorganismelor criofile (de exemplu, unele mucegaiuri ș. a.) care au uneori o activitate intensă chiar la temperaturi foarte scăzute.

3) *Metodele de conservare bazate pe principiul abiozei* creează condiții în care microorganismele sînt omorîte sau, în alte cazuri, rămîn viabile, dar existența lor nu se manifestă printr-o activitate care poate provoca alterarea alimentelor.

În practică se folosesc mai multe procedee:

a) *Prelucrarea termică* se realizează prin încălzirea în diferite moduri a alimentelor, efectuată în recipiente ermetic închise:

— Pasteurizarea, constînd în încălzirea la temperaturi sub 100°C, distruge numai formele vegetative. Produsul trebuie păstrat într-un recipient închis ermetic, pentru a se preîntîmpina o contaminare ulterioară de la exterior, și la temperaturi scăzute (4—5°C) pentru a se împiedica germinarea sporilor și dezvoltarea microorganismelor termofile care supraviețuiesc acestui tratament.

— Tindalizarea este o metodă de sterilizare completă care se realizează prin 2—3 pasteurizări la fiecare 24 de ore, interval în care produsul este păstrat la temperatura camerei pentru a permite germinarea tuturor sporilor, adică transformarea lor în forme vegetative care sînt distruse prin pasteurizarea următoare.

— Sterilizarea la vapori sub presiune, jumătate de oră la 120°C, este o metodă prin care microorganismele sînt, în general, distruse (atît formele lor vegetative cît și sporii).

În unele cazuri, din cauza unor deficiențe tehnice sau a unor condiții speciale, unii spori pot supraviețui (de exemplu, cei de *Bacillus thermophilus*, *Bacteroides thermophilus anaerobioticus* sau chiar *B. subtilis*, *B. mesentericus* ș. a.).

Supraviețuirea sporulaților aerobi nu are mare importanță practică, datorită faptului că multiplicarea lor este împiedicată de condițiile de anaerobioză strictă care se realizează în cutia de conserve. Sporii germenilor anaerobi germinează însă și provoacă modificări importante ale alimentului ca fermentarea cu acumulare de gaze, care determină bombarea caracteristică a cutiei, sau acrirea lui prin fermentare fără gaze, însoțită de producere de acizi.

Uneori, în alimentul conservat se poate dezvolta bacteria anaerobă *Clostridium botulinum* care, în condițiile optime oferite de anaerobioză și de substratul nutritiv, elaborează o cantitate mare de exotoxină capabilă să provoace o intoxicație gravă (*botulismul*), deseori mortală, atunci cînd alimentul conservat este consumat fără o prelucrare termică prealabilă (exotoxina este termolabilă).

b) *Conservarea alimentelor prin tratare cu substanțe antiseptice* are o utilizare din ce în ce mai limitată, deoarece substanțele folosite curent (acid salicilic, acid benzoic) pot fi dăunătoare pentru om.

c) *Conservarea prin afumare* determină impregnarea produsului alimentar cu diferite substanțe bactericide provenite din fum, ca aldehida și acidul formic, fenoli, crezoli, rășini volatile etc. Prin acest tratament nu se realizează însă o sterilizare completă a alimentului, din care cauză metoda nu este eficientă pentru conservare decît dacă este asociată cu uscarea sau sărarea.

d) *Conservarea prin uscare* (aplicabilă la lapte, ouă, fructe, carne etc.) creează condiții defavorabile pentru dezvoltarea microorganismelor, prin des-

hidratarea alimentelor care poate fi realizată prin mijloace naturale (expunere la căldură solară) sau în uscătoare industriale special construite (de exemplu, pentru prepararea laptelui-praf).

În alimentele conservate prin uscare, microorganismele, deşi complet inactive, rămîn totuşi în viaţă, uneori în număr foarte mare, astfel încît umezirea acestor alimente duce la alterarea lor rapidă.

În acelaşi timp, în produsele alimentare care conţineau înainte de preparare microorganisme patogene pentru om (de exemplu, praful de ouă), acestea supravieţuiesc, păstrîndu-şi virulenţa intactă astfel încît pot transmite îmbolnăviri grave atunci cînd aceste alimente sînt consumate fără a fi în prealabil fierte.

e) *Conservarea prin sărare* (adăugare de NaCl 15—20%) împiedică dezvoltarea microorganismelor, ca rezultat al producerii unei presiuni osmotice mari, care determină *plasmoliza* celulelor microbiene. Această metodă nu exclude alterările produse de microorganismele halofile, care cresc şi la o proporţie de NaCl 35% şi chiar pe cristalele de sare (de exemplu, *Serratia salinaria*, care produce apariţia de pete roşii ca fuxina, *Micrococcus roseus*, *Torula wemeri* ş. a).

f) *Conservarea cu ajutorul soluţiilor concentrate de zahăr* (pînă la 70%) se bazează pe un mod de acţiune similar aceluia al sărării şi este eficientă în special atunci cînd este asociată cu pasteurizarea sau cu fierberea. Alimentele conservate pe această cale (fructe în dulceaţă sau sub formă de gem etc.) rămîn totuşi expuse degradărilor produse de microorganismele zaharofile, întrucît acestea se înmulţesc chiar în soluţii zaharoase foarte concentrate.

4) *Metodele de conservare bazate pe principiul cenanabiozei* folosesc acidificarea naturală sau artificială a diferitelor alimente (fructe, legume etc.), prin care se împiedică dezvoltarea bacteriilor de putrefacţie.

a) *Conservarea în oţet* sau *marinarea* este o metodă foarte mult utilizată, în care se obţine acest efect prin adăugarea de acid acetic în concentraţie de cel puţin 4%. Acest procedeu nu realizează o sterilizare propriu-zisă, însă împiedică multiplicarea microorganismelor. Alimentele astfel conservate pot fi alterate de bacteriile acetice şi de unele mucegaiuri care se dezvoltă în medii slab acide.

b) *Conservarea prin murare* se bazează pe principiul unei acidicări naturale, realizate prin fermentaţie lactică.

Alimentele care urmează a fi conservate pe această cale (varză, castraveţi) sînt mai întîi sărate, ceea ce permite ieşirea la exterior a sucurilor celulare, cu o concentraţie în zahăr pînă la 4%, care sînt supuse fermentaţiei lactice naturale.

Alimentele conservate prin murare pot fi alterate de unele microorganisme, ca de exemplu *Oidium lactis* ş. a., care descompun acidul lactic, creînd în felul acesta condiţii favorabile pentru dezvoltarea bacteriilor care au supravieţuit în stare latentă sau care le contaminează dinafară.

5) *Metodele de conservare bazate pe principiul antibiozei* folosesc tratarea cu substanţe antibiotice, asociată cu conservarea la rece, cu scopul de a omorî microorganismele existente în aliment şi de a împiedica o eventuală contami-

nare suplimentară. Antibioticele folosite (aureomicina, tetraciclina, cloromicetina şi mai rar streptomicina şi penicilina) sub formă de antibiotice speciale „alimentare" (nepurificate) sînt fie introduse prin perfuzie carotidiană în sistemul circulator al animalelor mari, fie încorporate în alimente, fie dizolvate în lichide utilizate pentru impregnarea alimentelor prin imersie. Procedeul este aplicabil pînă în prezent la crustacei, păsări, peşte, carne şi lapte. Deşi se consideră că în general el este inofensiv pentru consumatori, mai ales în cazul alimentelor care sînt prelucrate termic, ceea ce distruge antibioticele, mulţi cercetători au rezerve faţă de acest procedeu datorită riscului de selecţie a unor germeni rezistenţi la antibiotice şi de sensibilizare a organismului ca rezultat al ingerării de antibiotice.

Scanned with OKEN Scanner

PROCESE DE DEGRADARE MICROBIANĂ ÎN NATURĂ

În afară de rolul lor esenţial în circulaţia elementelor biogene, procesele de degradare microbiană, care sînt foarte frecvente în natură, au şi o mare importanţă practică datorită pagubelor economice pe care le produc. Aproape toate produsele organice naturale, ca şi substanţele derivate din ele, îngropate în sol, dispar după un interval de timp variabil, ca urmare a activităţii microorganismelor. În general, o anumită substanţă organică nu este degradată integral de o singură specie de microorganisme. De obicei, atacul microbian este iniţiat de o specie care posedă enzimele extracelulare necesare unei prime scindări a substanţei complexe în componente mai simple şi este continuat, pe măsură ce degradarea avansează, de alte specii de microorganisme care metabolizează mai departe, mult mai rapid, substratele intermediare rezultate din activitatea de degradare iniţială. În alte cazuri, microorganismele se adsorb strîns pe substratul încă intact şi utilizează numai subunităţile din structura acestuia, care trec spontan în soluţie. În sfîrşit, substanţele anorganice prezente ca atare sau rezultate din degradările microbiene pot fi degradate nu prin activităţi enzimatice, ci sub acţiunea unor produşi ai metabolismului microbian.

Procesele de descompunere microbiană implică în unele cazuri (piele, lemn, hîrtie, textile) distrugerea unităţilor structurale, ceea ce are ca rezultat pierderea proprietăţilor funcţionale şi fizice ale acestor materiale, iar alteori (în special în cazul produselor alimentare) duc la apariţia unor produşi de catabolism (acizi din glucide, NH_3, baze organice, compuşi sulfuraţi din proteine, acizi, aldehide şi cetone din lipide), care dau gust şi miros neplăcut alimentelor sau sînt toxici.

1. DEGRADAREA MICROBIANĂ A MATERIALELOR DE NATURĂ PROTEICĂ

Descompunerea proteinelor se face în două faze: proteoliza, care implică o acţiune de scindare a macromoleculelor proteice, şi putrefacţia, care corespunde unei degradări a moleculelor peptidice mici şi a aminoacizilor rezultaţi din proteoliză.

Proteoliza constituie o fază distinctă, obligatorie a degradării bacteriene, deoarece, spre deosebire de unele mucegaiuri, bacteriile nu pot utiliza direct în metabolismul lor proteinele pure intacte. De aceea, degradarea bacteriană a proteinelor este condiţionată de prezenţa în mediu a unor derivaţi uşor metabolizaţi ai acestora (de exemplu, peptone), care permit creşterea bacteriilor şi

elaborarea enzimelor necesare metabolismului lor proteic (proteinaze, peptidaze). Microorganismele sintetizează proteaze care lucrează în condiţii foarte diferite de *p*H (*p*H 1,5—10,5) şi a căror acţiune nu are o specificitate marcată, astfel că se poate exercita indiferent de originea, mărimea sau gradul de solubilitate a proteinelor care îi servesc de substrat.

Putrefacţia reprezintă procesul de descompunere *anaerobă* a peptidelor rezultate din proteoliză, urmată de metabolizarea aminoacizilor lor constitutivi, cu eliberarea de produşi volatili rău mirositori. Procesul este realizat de bacterii anaerobe stricte, ca *Welchia perfringens, Clostridium putrificum, Cl. aerofoetidum, Cl. bifermentans, Cl. sporogenes, Cl. histolyticum* ş. a. Degradarea peptidelor din unele produse alimentare, cu efecte mai puţin dăunătoare, poate fi produsă şi de unele bacterii facultativ anaerobe, ca *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Achromobacter*, sau aerobe ca *B. subtilis, B. cereus*, precum şi de unii fungi din genurile *Penicillium, Aspergillus, Mucor* etc.

Metabolizarea aminoacizilor rezultaţi din degradarea anaerobă a peptidelor se face pe două căi:

1) *Decarboxilarea*, care se realizează în mediu uşor acid, ducînd, în cazul unor aminoacizi ca ornitina şi lizina, la formarea de *putrescină* şi respectiv *cadaverină*:

$$\underset{\text{ornitina}}{H_2NCH_2(CH_2)_2CH(NH_2)COOH} \xrightarrow[\text{ornitin-decarboxilaza}]{-CO_2} \underset{\text{putrescina}}{H_2NCH_2(CH_2)CH_2NH_2} \quad (1)$$

$$\underset{\text{lizina}}{H_2NCH_2(CH_2)_3CH(NH_2)COOH} \xrightarrow[\text{lizin-decarboxilaza}]{-CO_2} \underset{\text{cadaverina}}{H_2NCH_2(CH_2)_3CH_2NH_2} \quad (2)$$

2) *Dezaminarea*, care este singura cale de metabolizare a aminoacizilor în mediile cu *p*H neutru şi alcalin. În cursul procesului de putrefacţie, în afară de putrescină şi cadaverină, se mai produc *indol* şi *scatol* (din degradarea triptofanului), mercaptani, H_2S (în special din cisteină), NH_3 şi mulţi alţi produşi încă neidentificaţi.

Putrefacţia este evidentă numai în mediu neutru şi alcalin, deoarece la un *p*H acid se produce fixarea substanţelor volatile răspunzătoare de miros şi, probabil, oprirea formării proteazelor microbiene. Pe acest principiu se bazează conservarea unor alimente prin fermentaţia glucidelor solubile, proces prin care se acidifică mediul şi se împiedică dezvoltarea microflorei de putrefacţie.

Degradarea microbiană a proteinelor are numeroase aplicaţii practice. În condiţii naturale, în sol, ea reprezintă o fază importantă în circulaţia N în natură. Sînt degradate pe această cale chiar şi proteinele a căror structură le conferă proprietăţi mecanice particulare şi o mare rezistenţă la atacul microbian ca, de exemplu, *colagenul* din oase şi cartilagii (scindat de colagenazele bacteriilor din genul *Clostridium*: *Cl. perfringens* şi *Cl. histolyticum*), *elastina* din ţesutul conjunctiv şi ligamente (degradată de elastazele produse de *Bacillus* sp., *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp.) şi *keratinele* din păr, coarne, piele etc. În sfîrşit, microorganismele pot ataca şi unele materiale — rezultate din valorificarea unor produse animale conţinînd proteine structură deosebit de rezis-

tentă, aşa cum sînt pielea (colagen şi elastină), mătasea (în special fibroină) şi lîna (keratina); în anotimpul umed, aceasta din urmă poate fi deteriorată de *B. subtilis şi B. mesentericus*, chiar înainte de tundere. De extremă importanţă este procesul de putrefacţie care are loc în condiţii optime de anaerobioză în cazul conservelor de carne incomplet sterilizate.

2. ALTERAREA MICROBIANĂ A MATERIILOR GRASE

Deşi microorganismele nu atacă în mod normal substanţele grase în stare pură, numeroase produse de această natură pot fi totuşi degradate biologic dacă mai conţin şi diferite substanţe care permit microorganismelor să se multiplice şi, ulterior, să-şi manifeste activitatea lipolitică. Microorganismele degradează grăsimile prin procese enzimatice de hidroliză sau de oxidare. Hidroliza grăsimilor şi a uleiurilor are drept rezultat producerea de *glicerol* şi *acizi graşi liberi*, dintre care cei care sînt volatili dau un miros perceptibil de la distanţă. În cazul produselor alimentare, activitatea lipolitică de origine microbiană poate persista chiar şi după moartea microorganismelor, atît în produsele pasteurizate, cît şi în cele conservate prin frig, datorită marii rezistenţe la temperaturi extreme a unor dintre lipazele microbiene.

În mări şi oceane, acţiunea oxidantă a microorganismelor — bacterii, actinomicete şi fungi — este răspunzătoare de degradarea eficientă a păcurii şi a diferitelor produse petroliere (deversate anual în cantităţi de aproximativ cîteva sute de g/m^3 apă) prin descompunerea hidrocarburilor parafinice, aromatice şi naftenice. Datorită acestui proces microbian care se asociază şi cu alte mecanisme de epurare naturală, probabil mult mai puţin eficiente, ca evaporarea, emulsificarea, oxidarea spontană etc., suprafaţa oceanului este relativ curată, deşi în ultimii 50 de ani au fost vărsate în mări aproximativ 5 milioane tone de produse petroliere.

Există microorganisme ca *Pullularia pullulans, Phoma glomerata, Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. şi *Flavobacterium marinum*, capabile să altereze suprafeţele vopsite ale vaselor sau instalaţiile portuare, atunci cînd aceste suprafeţe prezintă fisuri şi sînt „contaminate" cu diferite substanţe nutritive, derivate fie din substrat, fie din mediu. Prezenţa fungilor în faza vegetativă de creştere măreşte reţenţia de impurităţi din mediu şi o dată cu aceasta, concentraţia în substanţe nutritive, ceea ce agravează evoluţia procesului de biodeteriorare.

3. DEGRADAREA MICROBIANĂ A BUMBACULUI

Produsele finite depozitate în condiţii de temperatură şi umiditate ridicate sînt degradate intens sub acţiunea unor microorganisme. Atacul unor bacterii din genurile *Cellvibrio, Cellulomonas, Cytophaga* şi a unor specii de fungi ca *Myrothecium verrucaria, Trichoderma viride* etc. are ca urmare pierderea rezistenţei fibrei, pătarea materialului determinată de eliberarea unor pigmenţi

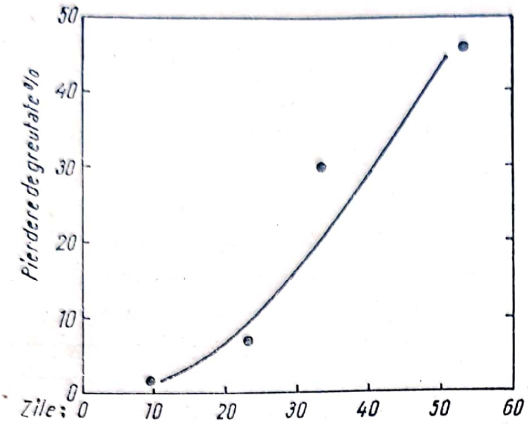


Fig. 464. Reprezentare schematică a procesului de degradare a bumbacului sub acţiunea celulazelor extracelulare de *Myrothecium verrucaria*. Degradarea este exprimată prin pierderea în greutate (%) datorită hidrolizei.

Fig. 465. Fir de bumbac în fază de degradare înaintată înconjurat de miceliul mucegaiului *Myrothecium verrucaria* (după Hill).

bacterieni sau de reacţia produşilor metabolismului microbian cu substanţele folosite în prelucrarea textilelor, precum şi producerea unor modificări chimice localizate, cărora li se datoresc defectele apărute după colorarea industrială a ţesăturilor.

4. DEGRADAREA MICROBIANĂ A CAUCIUCULUI ŞI A MASELOR PLASTICE

Cauciucul şi derivatele sale, considerate iniţial ca materiale relativ inerte, suferă procese de degradare lentă sub acţiunea a diferite microorganisme. Cauciucul natural, pur — o hidrocarbură nesaturată, cu formula $(C_5H_8)_n$ — este produs de un număr destul de mare de plante din familiile *Euphorbiaceae*, *Moraceae* şi *Apocyanaceae*, dar este obţinut în special din plantaţiile de arbore de cauciuc, *Hevea brasiliensis*. Faptul că, deşi produs de numeroase plante, cauciucul nu se acumulează niciodată în natură, constituie o probă evidentă a degradării lui în condiţii naturale. Alterarea microbiană cea mai activă este aceea a cauciucului natural pur şi a latexului de *Hevea* (cu un conţinut de 30—40% cauciuc pur) ale căror hidrocarburi constitutive suferă o degradare oxidativă mai rapidă, în comparaţie cu aceea a componenţilor cauciucului sintetic sau a produselor de cauciuc.

Multiplicarea microorganismelor pe cauciuc determină acoperirea lui cu pete albe sau colorate (roşii, albastre şi negre), după care se produce o umflare urmată de slăbirea structurii şi transformarea lui într-o masă sfărîmicioasă sau apariţia unor perforaţii. În afară de aceasta, ca rezultat al proceselor de degradare, cauciucul pierde, într-un timp scurt, o parte din greutatea sa iniţială.

Degradarea microbiană a cauciucului este mai intensă în condiţii de umiditate şi este proporţională cu suprafaţa expusă la dezvoltarea microorganismelor. Ea constă dintr-o oxidare completă, pînă la CO_2 şi apă, a hidrocarburilor

componente sau numai din degradarea lor parţială, care transformă cauciucul într-o masă sfărîmicioasă. Hidrocarburile din cauciuc sînt atacate de numeroase microorganisme din genurile *Pseudomonas, Bacillus, Mycobacterium, Actinomyces, Proactinomyces, Micromonospora, Aspergillus, Penicillium* etc., care se pot multiplica pe medii sintetice cu cauciuc ca sursă unică de C.

În natură, degradarea cauciucului este rezultatul activităţii comune a unui mare număr de microorganisme asociate şi are loc mai rapid şi mai intens decît în cazul acţiunii acestora în culturi pure. În condiţii normale, degradarea microbiană a hidrocarburilor din cauciuc poate fi socotită cantitativ neînsemnată în raport cu aceea produsă de căldură, lumină, alcali, acizi sau prin abraziune etc. Ea este totuşi deosebit de importantă sub raportul consecinţelor eventuale în cazul atacării învelişului izolator din cauciuc al cablurilor electrice îngropate în sol sau imerse în ape, procesele microbiene determinînd, într-un timp relativ scurt, o scădere considerabilă sau chiar o pierdere a capacităţii izolante a învelişului, cu toate urmările care pot decurge din aceasta.

Masele plastice (polietilenul, clorura de polivinil etc.) suferă şi ele diferite acţiuni microbiene care duc la alterarea calităţilor normale (transparenţă, rezistenţă etc.). Cele mai active în această privinţă sînt ciupercile din sol *Spicaria violacea, Fusarium* sp., *Metarrhizium anisopliae* ş. a., ale căror hife traversează masele plastice, ca şi cauciucul, prin microleziuni detectabile numai cu tehnici speciale.

5. TERMOGENEZA MICROBIANĂ

Degajarea de căldură de către microorganisme în timpul activităţii lor vitale este un fenomen general, variabil sub raport cantitativ şi condiţionat de utilizarea incompletă a energiei rezultate din oxidarea substanţelor organice în procesul respiraţiei. După datele lui T a u s o n, coeficientul de folosire de către microorganisme a energiei liberate în cursul metabolismului depăşeşte rar 40—50%, astfel că restul se pierde în mediu sub formă de căldură.

Acest proces poate fi deosebit de intens în cazul anumitor microorganisme *termofile*, ceea ce poate produce accidente grave şi pagube ca acelea datorate autoîncălzirii şi uneori aprinderii cerealelor depozitate, a clăilor de fîn, a silozurilor sau a combustibilului (turba şi cărbunele).

Depozitarea cerealelor şi a făinii în stare umedă este însoţită de dezvoltarea unor microorganisme care produc fermentaţii cu degajare de căldură. Cînd căldura este generată în straturile profunde, ea se acumulează acolo şi astfel se formează o zonă în care temperatura ajunge pînă la 60—80°C. Iniţial, creşterea de temperatură este datorată unor saprofiţi banali, dar cînd se atinge 40—50°C se creează condiţii optime de viaţă pentru microorganismele termotolerante şi termofile. Cerealele sînt alterate şi se transformă într-o masă carbonizată compactă, care poate fi dislocată numai cu lopata. În anumite condiţii, se poate produce chiar aprinderea spontană a depozitelor de cereale şi a clăilor de fîn.

Fenomene de „autoîncălzire" determinate de activitatea microorganismelor se produc şi în depozitele de combustibil (cărbune, turbă), cu cea mai mare

frecvenţă în cazul turbei brichetate. Dacă procesul de autoîncălzire durează mai mult timp (de exemplu, 2—3—5 luni la 70°C), turba se „coxifică", transformîndu-se într-o masă neagră, foarte poroasă şi sfărîmicioasă (semicocs). Datorită proceselor de ardere parţială, se produc concomitent diferite produse volatile şi carburante, similare acelora rezultate din distilarea uscată a lemnului, care se aprind în prezenţa oxigenului. Autoîncălzirea la o temperatură mai mare de 80°C nu mai este determinată însă de activitatea vitală a microorganismelor, ci rezultă din procese pur chimice, care duc la apariţia de gaze carburante, urmată de aprinderea acestora prin reacţii de oxidare catalitică a substanţelor organice în prezenţa oxigenului liber.

Există unele posibilităţi de folosire în scop practic a căldurii degajate în timpul proceselor de autoîncălzire ca, de exemplu, încălzirea serelor cu „combustibil biologic" obţinut prin dezvoltarea microorganismelor termofile în lăzi cu diferite deşeuri organice menţinute în stare umedă. De asemenea, gunoiul de grajd aşezat într-o răsadniţă sub stratul de sol menţine o temperatură ridicată în zilele friguroase de primăvară, ceea ce contribuie la dezvoltarea legumelor. În anumite condiţii, termoproducţia biologică poate fi, prin urmare, foarte utilă în agricultură.

Procese de termogeneză microbiană au loc, de asemenea, în gunoiul de grajd, constituit din paie şi dejecte (fecale şi urină) şi care are o microfloră foarte bogată şi variată. Ca şi în gunoaiele menajere, în gunoiul de grajd depus pe platforme special amenajate sau în grămezi se produce o multiplicare intensă a microflorei (pînă la 60—70 miliarde de germeni/gram), care degradează diferitele lui componente (celuloză, proteine, uree etc.) în compuşi mai simpli. Microflora gunoiului este formată din microorganisme celulozolitice aerobe şi anaerobe, bacili Gram-negativi (*Proteus* sp., *E. coli, P. aeruginosa*), bacili Gram-pozitivi (*B. subtilis, B. mesentericus, B. mycoïdes*), actinomicete şi ciuperci microscopice.

În timpul degradării microbiene a substanţelor organice din gunoaie se produce o ridicare de temperatură — favorizînd dezvoltarea de microorganisme termofile şi termotolerante — graţie căreia se realizează distrugerea microorganismelor patogene, a ouălor de helminţi intestinali etc. Căldura degajată în urma activităţii microbiene din gunoiul de grajd poate fi utilizată, aşa cum s-a arătat, în cultura legumelor, aşezîndu-se gunoi de grajd sub stratul de pămînt din răsadniţe, ceea ce asigură menţinerea în sol a unei temperaturi ridicate în zilele friguroase de primăvară.

6. PRODUCEREA MICROBIANĂ A „BIOGAZELOR"

„Biogazul" este un amestec de gaze combustibile, în care predomină metanul, obţinut ca rezultat al activităţii unor microorganisme care descompun în anaerobioză diferite substanţe organice. Procesul de formare a gazelor pe cale biochimică este foarte răspîndit în natură — în zăcămintele de petrol şi cărbuni, în nămolul apelor de canal, în nămolul bălţilor şi al lacurilor (de unde şi de-

numirea de *gaz de mlaştină* sau de baltă). Producerea „biogazului" poate fi organizată prin mijloace relativ simple, în vederea folosirii lui pentru producerea de energie calorică sau pentru mecanizarea unor procese de producţie. Materia primă utilizată pentru producerea gazelor combustibile o constituie gunoiul de grajd, paiele tocate şi diferite alte resturi organice din gospodărie. Fermentaţia se face în recipiente închise, cu alimentare continuă cu substanţe putrescibile, în condiţii de strictă anaerobioză, la întuneric şi la o temperatură de 30—34°C. Randamentul ei este foarte mare, reprezentînd aproximativ 175 l gaze combustibile pentru 1 kg de substanţă uscată de paie de grîu, 195 l pentru dejecţiunile animale, 286 l pentru fîn şi 313 l pentru gunoiul de grajd (Imhoff şi Bushwell). O cantitate de aproximativ 55—65% din amestecul care constituie biogazele este reprezentată de metan, gaz cu o energie calorică foarte mare (8 500 kcal/m^3). În acelaşi timp, reziduurile organice ale fermentaţiei pot fi folosite ca îngrăşăminte agricole, mai bogate în N, P, K şi Ca decît cele obţinute prin fermentarea obişnuită a gunoiului de grajd la platformă.

Microorganismele capabile să producă biogaze aparţin mai multor specii de bacterii anaerobe, ca *Methanobacterium omelianskii, M. suboxydans, M. formicum, M. propionicum, Methanosarcina methanica, Methanosarcina barkerii* etc.

7. COROZIUNEA BACTERIANĂ A METALELOR

Coroziunea metalelor este un proces determinat de multiple mecanisme interdependente: chimice, mecanice, electrice şi biologice. Datorită lor, fierul, oţelul, fonta şi alte metale menţinute într-un mediu apos suferă un proces de *coroziune,* în special din cauza acţiunii electrolitice care rezultă din diferenţele de potenţial dintre zonele anodice şi catodice de pe suprafaţa lor.

Un rol foarte important în coroziunea metalelor revine microorganismelor, şi anume bacteriilor anaerobe sulfat-reducătoare din sol. Coroziunea este frecventă la conductele de apă potabilă şi reziduală, de gaze şi de petrol, ca şi la cele care deservesc instalaţii sanitare (closete, băi). Ea începe prin apariţia unor pete de rugină în locul cărora se formează ulterior scobituri cu contur neregulat, adînci de 1—6 mm. În unele cazuri, coroziunea se poate întinde în suprafaţă şi în profunzime pe zone mai mari, provocînd scurgeri de petrol în jurul conductelor, explozii în apropierea conductelor de gaze sau pătrunderea microbilor din sol şi a unor germeni patogeni în conductele de apă potabilă. Conductele de fontă suferă un proces de *grafitizare,* în care metalul este corodat cu formare de sulfură feroasă şi hidroxid feros; ele îşi păstrează aspectul obişnuit, din cauza grafitului prezent în fontă, dar capătă o consistenţă atît de moale încît pot fi tăiate cu cuţitul.

Bacteriile sulfat-reducătoare care produc coroziunea fierului sînt foarte răspîndite în sol, în izvoarele sulfuroase, pe fundul apelor dulci şi în mări, uneori pînă la adîncimi de cîteva mii de metri. Ele sînt anaerobe obligate şi heterotrofe, dar se pot nutri şi autotrof în prezenţa hidrogenului, a CO_2 şi a sulfaţilor. Speciile cele mai active sînt: *Desulfovibrio desulfuricans, D. rubentschickii, D. aestuarii.*

Mecanismul chimic al coroziunii bacteriene este cunoscut. În mediu umed, suprafaţa fierului conţine numeroase sisteme electrochimice, ale căror elemente catodice — în condiţii neutre şi în absenţa O_2 — sînt polarizate de H. Bacteriile sulfat-reducătoare, care au în echipamentul lor enzimatic un sistem de hidrogenaze, pot folosi H molecular şi catodic. Ele oxidează suprafaţa metalului şi, concomitent, reduc sărurile de sulf cu producere de acid sulfuric, care se combină cu metalul formînd sulfură feroasă. Astfel, pereţii conductei sînt distruşi, fierul trecînd în soluţie la elementele anodice, dovadă scăderea greutăţii conductei.

În condiţii naturale, bacteriile sulfat-reducătoare folosesc ca acceptor de H sulfaţii, sulfiţii, tiosulfiţii, metabisulfitul etc. Reacţia chimică a proceselor respective este următoarea: $4\,Fe + H_2SO_4 + 2\,H_2O \rightarrow 3\,Fe(OH)_2 + FeS$ şi se desfăşoară, după Starkey şi Wight, cu următoarele trepte intermediare:

(*1*) $8\,H_2O \rightarrow 8\,H^+ + 8\,OH^-$; (*2*) $4\,Fe \rightarrow 4\,Fe^{++} + 8e$ (soluţie anodică de fier); (*3*) $8e + 8\,H^+ \rightarrow 8\,H$ (catod); (*4*) $8\,H + H_2SO_4 \rightleftharpoons H_2S + 4\,H_2O$ (depolarizare prin oxidarea H catodic de către bacteriile sulfat-reducătoare);

$$\left.\begin{array}{l}(5)\ Fe^{++} + H_2S \rightleftharpoons FeS + 2H^+ \\ (6)\ 3\,Fe^{++} + 6(OH)^- \rightleftharpoons 3\,Fe(OH)_2\end{array}\right\}\ \text{formare de produşi de coroziune}$$

Pe conductele de apă sau de gaze, în canale etc., modificările apar pe suprafaţa externă, unde condiţiile de dezvoltare a microflorei sînt optime. În bazinele de păstrare a ţiţeiului, coroziunea este mai frecventă pe faţa internă şi în special pe fund, unde se fac acumulări de substanţe organice care asigură condiţii optime pentru dezvoltarea microorganismelor.

În coroziunea oxidativă a conductelor de fier sînt implicate, după un mecanism încă necunoscut, mai multe specii de bacterii aparţinînd genului *Thiobacillus*.

În afară de pagubele şi pericolul pe care le provoacă prin deteriorarea reţelelor de apă şi gaze, coroziunea bacteriană a metalelor poate reprezenta un factor dăunător şi în procesele de forare şi extracţie din explorările petroliere.

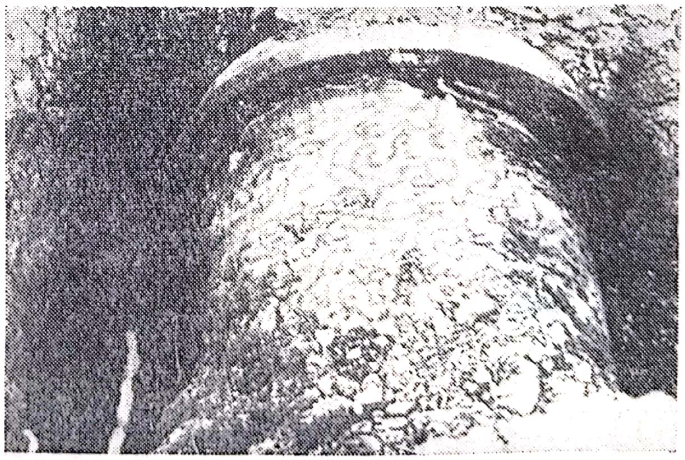


Fig. 466. Conductă de petrol prezentînd urme de coroziune bacteriană (după Beckwith).

dat fiind că bacteriile sulfat-reducătoare sînt adaptate să trăiască şi să se multiplice în zăcămintele subterane de petrol, chiar la adîncimi mari (900—1 800 m). În S.U.A., în funcţie de particularităţile solului, 20—97% din conductele de petrol sînt atacate de bacterii, ceea ce produce pagube anuale considerabile.

8. BLOCAREA BACTERIANĂ A CONDUCTELOR DE APĂ

În afară de coroziunea bacteriană a metalului, conductele de apă mai pot suferi fenomenul de „blocare", un alt tip de acţiune dăunătoare datorată microorganismelor. Unele specii de bacterii ferice filamentoase ca, de exemplu, *Crenothrix polyspora*, pătrund în reţeaua de apă şi se fixează cu o extremitate a filamentului de peretele intern al conductei. Aceasta este mai mult sau mai puţin blocată de masa de corpi bacterieni şi de cantitatea mare de hidroxid de fier care se depune în urma activităţii bacteriene.

Creşterea bacteriilor ferice este favorizată de prezenţa sărurilor feroase, a unor substanţe organice şi a CO_2 dizolvat, ca şi de o oarecare aciditate a mediului. De cele mai multe ori sursa de fier este reprezentată chiar de apa din conductă, exceptînd cazurile în care prezenţa bacteriilor sulfat-reducătoare determină concomitent şi o coroziune a fierului din peretele conductei. În aceste condiţii, precipitarea unei cantităţi mari de hidroxid feric coloidal — $Fe_2(OH)_6$ — produce blocarea reţelelor de apă, a filtrelor etc. (bioblocarea conductelor). Apa capătă o turbiditate roşiatică, miros şi gust neplăcut. Tot sub acţiunea bacteriilor ferice, pe suprafaţa internă a conductelor de fier mai pot apărea formaţii cu aspectul unor tuberculi constituiţi din incrustaţii nodulare, care împiedică scurgerea apei.

Multiplicarea bacteriilor ferice în conducte este împiedicată prin clorinarea apei, iar în cazurile extreme prin căptuşirea conductei cu un strat de ciment sau bitum.

9. ALTERAREA MICROBIANĂ A SUPRAFEŢELOR DE STICLĂ

Unele microorganisme ca *Alternaria, Aspergillus, Basisporium, Cladosporium, Monilia, Penicillium, Pullularia* se pot dezvolta pe sticlă dacă suprafaţa acesteia este acoperită cu impurităţi care conţin substanţe nutritive pentru fungi. „Leziunile" fungice apar în special pe suprafeţele de sticlă folosite în optică, fiind probabil favorizate de acţiunea mecanică de şlefuire, şi pe vitraliile expuse multă vreme condiţiilor de temperatură şi umiditate caracteristice regiunilor tropicale şi subtropicale. Aceste leziuni sînt probabil datorate în mare măsură acizilor organici produşi în cursul metabolismului microbian.

BIBLIOGRAFIE[1]

1. Adams, M. H., *Bacteriophages*. New York, Interscience Publ., 1959, 592 p.
2. *Adaptation in microorganisms*. Third Symposium of the Society for General Microbiology, London, Cambridge, Univ. Press, 1953, 360 p.
3. Adelberg, E. A. (sub red.), *Papers on Bacterial Genetics*. Little Brown, 1966, p. 400.
4. Ainsworth, G. C., Sussman, A. S., *The Fungi*. An Advanced Treatise, New York, Academic Press, 1965, 2 vol. 1966.
5. Airò, R., Astaldi, G., *Ricenti acquisizioni sulla reattività del linfocito*, "Haematologica Latina", 1967, 3, p. 209—270.
6. Alexander, M., *Introduction to Soil Microbiology*, New York, J. Wiley and Sons, 1961, 472 p.
7. Alexander, M., *Biochemical Ecology of Soil Microorganisms*, "Ann. Rev. of Microbiology", 1964, 16, p. 217—252.
8. Ames, N. B., Martin, R. G., *Biochemical Aspects of Genetics; the Operon*, "Ann. Review of Biochemistry", 1964, 33, p. 235—258.
9. Anderson, C. G., *An Introduction to Bacteriological Chemistry*. Edinburg, E. & S. Livingstone, 1948, 495 p.
10. *Autotrophic Microorganisms*. IVth Symposium of the Society for General Microbiology, London, Cambridge, Univ. Press, 1954, 305 p.
11. *Bacterial Anatomy*. Sixth Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge, Univ. Press, 1956, 362 p.
12. Baron, S., Levy, H. B., *Interferon*, "Ann. Rev. of Microbiology", 1966, 20, p. 291—318.
13. Beckhorn, E. J., Labbee, M. D., Underkofler, L. A., *Production and Use of Microbial Enzymes for Food Processing*, "Agricultural and Food Chemistry", 1965, 13, p. 30—34.
14. Begg, C. M. M., *An Introduction to Genetics. London*, "English Univ. Press", 1959, 292 p.
15. Bennett Claude, J., *Genetic Coding for Protein Structure*, "Ann. Review of Biochemistry", 1964, 33, p. 205—234.
16. *Biochemical Studies of Antimicrobial Drugs*. Sixteenth Symposium of the Society for General Microbiology, Cambridge, Univ. Press, 1966, p. 349.
17. Bocciarelli, D. S., *The Structure and Development of Animal Viruses*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, Pergamon Press, Oxford, 1965, 15, p. 151—192.

[1] Cuprinde numai lucrările de bază folosite (tratate, manuale, monografii) și unele articole din periodice care aduc contribuții speciale referitoare la problemele tratate.

Scanned with OKEN Scanner

91. Jacobs, M. B. (ş.a.)., *Dictionary of Microbiology*. New York, D. van Nostrand, 1957, 276 p.
92. Jacobs, M. B., Gerstein, M. J., *Handbook of Microbiology*. Priceton, Van Nostrand Co., 1965.
93. Jones, C., Witton, H., *Laboratory Manual for Microbiology*. New York, Mc Graw-Hill Book, co., 1952, 435 p.
94. Kabat, E. A., *Experimental Immunochemistry*. Springfield, C. C. Thomas, 1958, 576 p.
95. Kelly, D. P., *Problems of the Autotrophic Microorganisms*. Science Progr. Oxf., 1967, 55, p. 35—51.
96. Kelly, F. C., Hite, K. E., *Microbiology*. New York, Appleton Century Crofts, 1955, 614 p.
97. Kilkson, R., *Structure and Evolution of Viruses, a Limiting Theory*. Experimental Cell Research, 1965, 39, p. 265—285.
98. Kinoshita, S., *The Production of Aminoacids by Fermentation Processes*. Adv. Applied Microb., 1959, 1, p. 201—214.
99. Kleinschmidt, A. K., *Nucleinsäuren Architektur und Wandlungsfähigkeit im molekularen Bild*. Die Naturwissenschaften, 1967, 15/16, p. 417—428.
100. Knaysi, G., *Elements of Bacterial Cytology*. New York, Comstock Publ., 1951, 375 p.
101. Krasilnikov, N. A., *Antagonismul microbian şi substanţele antibiotice*. Bucureşti, Editura Academiei R.S.R., 1961, 488 p. (trad. din l. rusă).
102. Lamanna, C., Mallette, F. M., *Basic Bacteriology. Its Biological and Chemical Background*. 2nd ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1949, 853 p.
103. Lamotte, M., L'Héritier, P., *Biologie générale. Structure de la cellule. Réproduction sexuée*. Paris. Ed. Doin. Deren & Co., 1965, 270 p.
104. Lamotte, M., L'Héritier, P., *Biologie générale. Lois et mécanismes de l'Hérédité*. Paris. Ed. Doin. Deren & Co., 1966, 291 p.
105. Langeron, M., *Précis de microscopie*. Paris, Masson, 1949, 1430 p.
106. Le Guyon, R., *Précis de bactériologie*. Paris, G. Doin, 1961, 955 p.
107. Leifson, E., *Atlas of Bacterial Flagellation*. New York, Academic Press, 1960, 170 p.
108. Levaditi, C., Lépine, P., *Les ultravirus des maladies humaines*. Vol. I—II, Paris, Maloine, 1948, 1876 p.
109. Levintow, L., *The Biochemistry of Virus Replication*, Ann. Rev. Biochem., 1965, 34, p. 487—526.
110. Luria, S. E., *General Virology*. New York, John Wiley, 1953, 427 p.
111. Luria, L. S. E., Darnell, J. E. Jr., *General Virology*. New York. London. John Wiley & Sons Inc., 1967, 512 p.
112. Lwoff, A., *L'évolution physiologique. Etude des pertes de fonctions chez les microorganismes*. Paris. Herman & Co. 1943, 308 p.
113. Lwoff, A., *The Concept of Virus*, "J. of Gen. Microbiology", 1957, 17, p. 239—253.
114. Lwoff, A., *The Dynamics of Viral Functions*. Proc. Roy. Soc. B. London, 1961, 3, 154, p. 1—20.
115. Lwoff, A., *Lysogeny*, "Bact. Rev.", 1953, 17, p. 269.
116. Maas, W. K., McFall, E., *Genetic Aspects of Metabolic Control*, Ann. Rev. Microbiology, 1964, 18, p. 95—110.

Scanned with OKEN Scanner

141. Pirie, N. W., *Biological Organization of Viruses.* Ciba Foundation Symposium on Principles of Biomolecular Organization. 1966, p. 136—152.
142. Pochon, J., Barjac, H. de, *Traité de microbiologie des sols. Applications agronomiques.* Paris, Dunod, 1958, 685 p.
143. Pochon, J., Tchan, T. Y., *Précis de microbiologie du sol.* Paris, Masson, 1948, 222 p.
144. Pollard, M. (ed.), *Perspectives in virology.* New York, John Wiley, 1959, 312 p.
145. Peskov, M. A., *Titologhia bakterii.* Moskva-Leningrad, Izd. A.M. SSSR, 1955, 220 p.
146. Porter, J. R., *Bacterial chemistry and Physiology.* 5th ed. New York, John Wiley, 1950, 1073 p.
147. Prescott, S. C., Dunn, C. C., *Industrial Microbiology.* 2nd ed. New York, Mc. Graw Hill, 1959, 945 p.
148. Prévot, A. R. *Biologie des maladies deus aux anaérobies.* Paris, Flammarion, 1955, 580 p.
149. Prévot, A. R., *Traité de Systématique bactérienne.* Vol. I—II, Paris, Dunod, 1961, 471 p. (I), 771 p. (II).
150. Quastel, J. H., *Soil Metabolism.* Ann. Rev. of Plant Physiology, 1965, 16, p. 217—240.
151. Raffel, Sidney, *Immunity Hypersensitivity Serology.* New York, Appleton Century-Crofts, 1953, 5311 p.
152. Rainbow, C., Rose, A. H., *Biochemistry of Industrial Microorganisms.* London, Academic Press, 1963, 669 p.
153. Raper, J. R., Esser, K., *The Fungi.* in The Cell (ed.) Brachet New York, Academic Press, vol. VI, p. 140—244.
154. Raven, H. M., *Biochemisches Taschenbuch.* Berlin. Springer-Verlag, 1956, p. 1332.
155. Ravin, A. W., *The Evolution of Genetics.* Academic Press. New York & London, 1965, 216 p.
156. Rhodes, A. J., Van Rooyen, C. E., *Texbook of Virology.* Baltimore, Williams and Wilkins, 1958, 642 p.
157. Rivers, Th., Horsfall, F. L., *Viral and Rickettsial Infections of Man.* 3rd ed. Philadelphia, J. P. Lippincott, 1959, 967 p.
158. Rose, A. H., *Industrial Microbiology,* ed. Butterworths, London, 1961, p. 286.
159. Rosen, R., *Recent Developments in the Theory of Control and Regulation of Cellular Processes.* "Int. Review of Cytology", 1968. 23, p. 25—88.
160. Rovira, A. D., *Interactions between Plant Roots and Soil Microorganisms,* "Ann. Review of Microbiology", 1965, 19, p. 241—266.
161. Salle, A. J., *Fundamental Principles of Bacteriology.* New York, Mc Graw Hill, 1961, 797 p.
162. Sarles, W. B., Frazier, W. C., Wilson, J. B., Knight, S. G., *Microbiology General and Applied.* New York, Harper & Brth, 1965, 491 p.
163. Săvulescu, Olga, *Elemente de Micologie.* București, Editura didactică și pedagogică, 1964, 212 p.
164. Săvulescu, Tr., Săvulescu, O., *Tratat de Patologie vegetală.* Vol. I, București, Editura Academiei R.S.R., 1959, 725 p.
165. Scanga, F., *La cellula batterica.* Roma, II, Pensiero Scientifico, 1934, 449 p.
166. Scanga, F., *Virus e rickettsie.* Roma, Collona scientifica, I.F.I., 440 p.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele periodice consultate:

— Acta virologica, Praga.
— Acta pathologica, microbiologica Scandinavica, Copenhaga.
— Advances in Applied Microbiology, New York.
— Advances in Immunology, New York.
— Advances in Virus Research, Basel, New York.
— Annales de l'Institut Pasteur, Paris.
— Annali di Microbiologia ed enzimologia, Milano.
— L'Année biologique, Paris.
— Annual Review of Biochemistry, Standford.
— Annual Review of Microbiology, Stanford.
— Antonie van Leeuwenhoek, Amsterdam.
— Applied Microbiology, Baltimore.
— Archives roumaines de Pathologie expérimentale et de Microbiologie, Bucureşti.
— Archiv für die Gesamte Virusforschung, Viena.
— Archiv für Mikrobiologie, Berlin.
— Australian Journal of Experimental Biology & Medical Sciences, Melbourne.
— Bacteriological Reviews, Baltimore.
— Biochimica, Biophysica Acta, Amsterdam.
— Biological Reviews, Cambridge.
— Bolletino Istituto Sieroterapico Milanese, Milano.
— Bulletin de l'Institut Pasteur, Paris.
— Bulletin de la Société de Chimie Biologique, Paris.
— Canadian Journal of Microbiology, Ottawa.
— Endeavour, Londra
— Experientia, Basel.
— Experimental Cell Research, New York.
— Giornale di Microbiologia, Milano.
— Immunochemistry, Oxford.
— Immunology, Oxford.
— Journal of Applied Bacteriology, Londra.
— Journal of Bacteriology, Baltimore.
— Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, U.S.A.
— Journal of Cell Biology, New York.
— Journal of General Microbiology, Londra.
— Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology, Praga.
— Journal of Immunology, Baltimore.
— Jurnal of Molecular Biology, London.
— Jurnal Mikrobiologhii, Epidemiologhii, Immunobiologhii, Moscova.
— Journal of Theoretical Biology, New York.
— Journal of Ultrastructure Research, New York.
— Microbiologia española, Madrid.
— Microbiologie, Parazitologie, Epidemiologie, Bucureşti.
— Nature, London.
— Naturwissenschaften, Berlin.

— Pathologia et Microbiologia, Basel.
— Mikrobiologhiia, Moscova.
— Progress in Medical Virology, Basel.
— Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Sciences, Londra.
— Proceedings of the Society of Experimental Biology, New York.
— Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol, Paris.
— Revue d'Immunologie et de Thérapie antimicrobienne, Paris.
— Texas Reports on Biology and Medicine, Galveston.
— Transactions of the New York Academy of Sciences, New York.
— Virology, New York.
— Voprosîi Virusologhii, Moscova.
— Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie, Morphologie, Physiologie und Ökologie der Mikroorganismen, Berlin.
— Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Stuttgart.

Scanned with OKEN Scanner

Nr. colilor de tipar: 42,50

Întreprinderea poligrafică Sibiu
str. N. Bălcescu nr. 17
Republica Socialistă România
Comanda nr. 192/2727

Scanned with OKEN Scanner

E R A T A

Pag.	Rîndul	În loc de:	Se va citi:
179	21 de sus	limitante	limitate
230	14 de jos	după o acțiune prelungită. Cu toate acestea, caracterizarea corectă a unei sub-	2) viteza de apariție a efectului nociv; 3) interrelația dintre concentrația sub-
245	8 de sus	*C. Botulinum*	*C. botulinum*
339	2 de jos	citirea	și că citirea
343	9 de sus	Descrierea	Descifrarea
373	22 de sus	de retroinhibiția	cu retroinhibiția
415	8 de jos	factorului *L*	factorului *F*
501	34 de sus	limfocide	limfoide
566	3 de jos	CH_4+4H_2	CH_4+2H_2
568	28 de jos	își modifică	îi modifică
568	27 de jos	gazdelor	gazelor
633	5 de jos	A_3	A_1
635	6 de jos	(sursă de O)	(sursă de C)

Scanned with OKEN Scanner

MUTAȚIA VIRUSURILOR GRIPALE

I Mutația naturală
- 1. Variația antigenică
  - „imunological or antigenic drift"
  - „major antigenic shifts"
- 2. Variația biologică

II Mutația indusă prin:

1. Agenți biologici:
   - a. adaptarea prin pasaje succesive pe diverse gazde normale (Pauker 1960; Cohen 1960; Sokolov 1963; Choppin 1960, 1963; Borecký 1964, 1965, 1966; Janda 1968; Vonka 1968; Tučkova 1968)
   - b. presiunea imunologică (Atanasiu 1959; Hamre 1951; Mogill 1961; Laver și Webster 1968)
2. Agenți fizici (RUV, temperatura) și chimici (xenalamina) (Björkman și Horsfall 1948; Sokolov 1963; Simpson și Hirst 1968; Maassab 1968; Medvedeva 1968)

Scanned with OKEN Scanner

MUTAȚIA VIRUSURILOR GRIPALE

I Mutația naturală
- 1. Variația antigenică
  - „imunological or antigenic drift"
  - „major antigenic shifts"
- 2. Variația biologică

II Mutația indusă prin:

1. Agenți biologici:
   - a. adaptarea prin pasaje succesive pe diverse gazde normale (Pauker 1960; Cohen 1960; Sokolov 1963; Choppin 1960, 1963; Borecký 1964, 1965, 1966; Janda 1968; Vonka 1968; Tučkova 1968)
   - b. presiunea imunologică (Atanasiu 1959; Hamre 1951; Mogill 1961; Laver și Webster 1968)
2. Agenți fizici (RUV, temperatura) și chimici (xenalamina) (Björkman și Horsfall 1948; Sokolov 1963; Simpson și Hirst 1968; Maassab 1968; Medvedeva 1968)

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner